

Untersuchungen über Angriffspunkte des Morphins bei
der Entwicklung der körperlichen Abhängigkeit

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Erika Laschka

München, 5. Mai 1975

Untersuchungen über Angriffspunkte des Morphins bei
der Entwicklung der körperlichen Abhängigkeit

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Erika Laschka

München, 5. Mai 1975



1. Berichterstatter:	Prof. Autrum
2. Berichterstatter:	Prof. Bruckmoser
Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.1975	

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung und Fragestellung	1
B. Material und Methode	4
1. Entzugsbeobachtung und Erfassung der Symptome	5
2. Systemische Injektionen	6
3. Intracerebrale Injektionen	6
3.1. Injektionen in das gesamte Ventrikelsystem	8
3.2. Injektionen in abgegrenzte Abschnitte des Ventrikelsystems	9
3.3. Mikroinjektionen in verschiedene Kerngebiete	9
3.4. Versuche mit ³ H-Levallorphan	10
4. Morphinantagonisten	11
5. Statistik	11
C. Ergebnisse	11
1. Entzugsprovokation durch Levallorphan	11
1.1. Vergleich des Entzugsprofils nach systemischer und zentraler Applikation	13
2. Entzugsprovokation durch Diallyl-nor-morphin und Nalorphan	14
3. Entzugsprovokation durch SH 254	18
4. Ventrikelabgrenzungsversuche	19
4.1. Experimente mit ³ H-Levallorphan	23
5. Mikroinjektionen	25
5.1. Mikroinjektionen mit Levallorphan	25
5.2. Mikroinjektionen mit ³ H-Levallorphan	28
D. Diskussion	31
E. Zusammenfassung	40
F. Literatur	42

Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die biologischen Mechanismen, die bei wiederholter Einnahme von Morphin - ein aus dem Opium gewonnenes Alkaloid - und seinen Derivaten (Opiate) zu körperlicher Abhängigkeit führen, sind bisher noch weitgehend ungeklärt (siehe Way und Herz, 1975; Herz und Bläsig, 1974). Offenbar laufen bei der Entwicklung der Morphinabhängigkeit Anpassungsprozesse des Organismus an das Pharmakon ab; das Verständnis dieser Prozesse ist insofern von großer Bedeutung, als möglicherweise auch andere Adaptionsvorgänge im Gehirn auf ähnlichen Mechanismen beruhen.

Die Wirkungen des Morphins sind bei Mensch und Wirbeltier ähnlich. Der therapeutisch genutzte Effekt der Substanz besteht hauptsächlich darin, die Schmerzempfindung bei vollem Bewußtsein zu hemmen. Daneben kommt es zu einer Reihe anderer Wirkungen, wie z.B. Atemdepression und Obstipation. Beim Menschen stellt sich zudem eine euphorische Stimmungslage ein, die in dem Konsumenten des Morphins den Wunsch nach Wiederholung weckt. Auf diese Weise kann eine psychische Abhängigkeit von der Substanz entstehen.

Wird das Alkaloid dem Körper chronisch zugeführt, so verringert sich zunehmend seine Wirksamkeit. Es kommt zur Gewöhnung (Toleranz), d.h. es sind immer höhere Dosen erforderlich, um eine gleiche Wirkung zu erzielen. Wie man heute weiß, ist dieses Phänomen nicht auf beschleunigten Abbau oder Ausscheidung der Substanz zurückzuführen. Der Körper stellt sich vielmehr in noch unbekannter Weise auf die ständige Morphinzufuhr ein: wird nämlich die Substanz abgesetzt, so kommt es zu spontanen Entzugerscheinungen. Damit ist die physische Abhängigkeit, die sich offenbar parallel zur Gewöhnung entwickelt hat, sichtbar geworden.

Entzugerscheinungen lassen sich auch provozieren, indem man, z.B. im Tierexperiment, spezifische Morphinantagonisten appliziert. Diese Antagonisten, die mit Morphin chemisch nahe verwandt sind, können bereits in kleinen Dosen die akuten Wirkungen des Morphins wieder aufheben. Untersuchungen über die Interaktion der Substanzen zeigten, daß Morphin und seine Antagonisten an demselben Rezeptor angreifen, wobei das Morphin durch einen kompetitiven Mechanismus von seiner Bindungsstelle verdrängt wird (Cox und Weinstock, 1966; Pert und Snyder, 1973). Man kann daher aus dem Angriffsort der Antagonisten auf den Angriffsort des Morphins selbst schließen.

Da der durch Antagonisten ausgelöste Entzug innerhalb kurzer Zeit und verstärkt abläuft, wird er besonders häufig für quantitative tierexperimentelle Untersuchungen herangezogen. Er besteht aus einer Vielzahl einzelner Symptome, in denen sich die körperliche Abhängigkeit widerspiegelt und deren möglichst genaue Erfassung Voraussetzung für alle die Morphinabhängigkeit betreffenden Untersuchungen ist. Bei den in unserem Laboratorium durchgeführten quantitativen Studien wurde eine gegenläufige Entwicklung ('shift') der verschiedenen Symptome gefunden: 'rezessive' Entzugszeichen, die bereits bei schwacher Abhängigkeit auftraten, verschwanden in dem Maße, in dem andere, 'dominante', sich bei starker Abhängigkeit entwickelten (Bläsig et al., 1973^a). Die quantitative Erfassung des Entzugs wird durch dieses Phänomen erschwert. Bisher verwendete Methoden nämlich - wie z.B. das Aufaddieren unterschiedlich gewichteter Symptome (siehe Halbach und Eddy, 1963) oder das Auswerten nur einzelner Entzugszeichen (Buckett, 1964) - sind daher wenig geeignet, Aufschluß über die Schwere eines beobachteten Entzugssyndroms zu geben. Es ist vielmehr notwendig, das Entzugsmuster bei verschiedenen Abhängigkeitsgraden zu verfolgen, um entscheiden zu können, welche Symptome einem schweren, welche nur einem schwachen Entzugssyndrom zuzuordnen sind. Wie es zu diesem 'shift' der Symptome kommt, ist bisher noch nicht geklärt. Möglicherweise wird durch das Auslösen eines dominanten Symptoms ein Regelkreis angesprochen, der die für die Entwicklung eines rezessiven Symptoms erforderlichen Reaktionen hemmt.

Über Wirkungsorte des Morphins im Zentralnervensystem (ZNS) ist bisher sehr wenig bekannt. Mit den für die analgetische Wirkung des Morphins verantwortlichen Angriffspunkten beschäftigten sich eine Reihe von Untersuchungen. Dabei zeigten Versuche mit intraventrikulär appliziertem Morphin, bei denen eine starke antinozizeptive Wirkung erzielt wurde, daß periventrikuläre Strukturen in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind (Lockett und Davis, 1958; Horlington und Lockett, 1959; Adler, 1963, 1964). Angriffspunkte in der Umgebung des 3. Ventrikels postulierten vor allem Tsou und Jang (1964) aufgrund ihrer Experimente am Kaninchen. Andere Autoren vermuteten dagegen hauptsächlich in Strukturen nahe der dorsalen Oberfläche des unteren Hirnstamms primäre Wirkungsorte des Morphins für bestimmte nozizeptive Reaktionen (siehe Herz et al., 1970; Herz, 1973; Teschemacher et al., 1973; Vigouret et al., 1973; Pert und Yaksch, 1975). Auf ähnlich gelegene Kerngebiete lassen elektroencephalographische Daten über die durch Morphin bewirkte Dämpfung der Vigilanz am Kaninchen schließen (Albus und Herz, 1972).

Die durch Morphin erzeugbare Analgesie repräsentiert nur eine der vielfältigen akuten Wirkungen dieser Substanz. Es ist schwer vorstellbar, daß das gesamte Wirkungsspektrum von einem einzigen umschriebenen Kerngebiet her ausgelöst wird. Wahrscheinlich gibt es mehrere, hauptsächlich im Gehirn gelegene Angriffspunkte. Man muß wohl vermuten, daß alle diese Strukturen auch Abhängigkeit entwickeln. Ein Hinweis darauf ist die spiegelbildliche Ausprägung von Symptomen akuter Morphinwirkung und von Entzugssymptomen. So wirkt beispielsweise akut verabreichtes Morphin obstipativ und atemdepressiv; dagegen ist das Entzugsgeschehen charakterisiert durch Diarrhoe und beschleunigte Atmung. Möglicherweise werden die akuten Wirkungen des Morphins von den gleichen Strukturen her ausgelöst wie die chronischen Effekte des Pharmakons.

Für diese letztere Annahme sprechen Untersuchungen von Herz und Mitarbeitern (1972), die nach Gabe von Morphinantagonisten in den abgegrenzten 4. Ventrikel morphinabhängiger Kaninchen ein schweres Abstinenzsyndrom auslösen konnten. Aufgrund früherer Studien mit derselben Methode wurden in dieser Region auch die entscheidenden Angriffspunkte für die akute Morphinwirkung vermutet (vgl. Herz et al., 1970). Dagegen lassen die Ergebnisse von Wei und Mitarbeitern (1972) nach Applikation von kristallinem Naloxon in verschiedene Areale des ZNS morphinabhängiger Ratten vor allem auf den medialen Thalamus als primären Wirkungsort für die Auslösung des Entzugssyndroms schließen. Man muß hier allerdings anmerken, daß Strukturen des unteren Hirnstamms bei diesen letzteren Studien nicht untersucht wurden. Auch nach Ausschaltung bestimmter Hirnareale erzielte Befunde wiesen dem Zwischenhirn eine maßgebliche Rolle bei der Abhängigkeitsentwicklung zu. So führte elektrolytische Zerstörung ventromedialer Kerngebiete des Hypothalamus zu einer Überempfindlichkeit gegen Morphin und zu einem abgeschwächten Entzugssyndrom bei morphinabhängigen Ratten (Kerr und Pozuelo, 1971). Andere Autoren fanden nach Ausschaltung dieses Kerngebietes eine Beeinflussung der Morphineinnahme (Trinken morphinhaltiger Lösungen) bei Ratten (Amit et al., 1973), ein Befund, der sich auch beim Rhesusaffen nach elektrolytischer Durchtrennung des nigrostriatalen Faserbündels einstellte (Pozuelo und Kerr, 1972). Man muß bei diesen Experimenten allerdings immer in Betracht ziehen, daß solche Ausschaltungen bestimmter Kerngebiete keine gesicherte Aussage über primäre Angriffspunkte des Morphins zulassen, da sekundär betroffene Strukturen für die gefundenen Effekte verantwortlich sein können. Dagegen sind in diesem Zusammenhang bilaterale Läsionen von Cingulum, Amygdala und Septum sowie dorsomedialer thalamischer Kerngebiete von Interesse, die das Abstinenzsyndrom der Ratte unbeeinflusst ließen (Wikler et al., 1972).

Fragestellung

Eine Möglichkeit, genauere Informationen über primäre Wirkungsorte bei der Entwicklung der Morphinabhängigkeit zu erhalten, ist in der lokalen Applikation von Antagonisten gegeben, nachdem - wie vorher ausgeführt - diese offenbar an demselben Rezeptor wie das Morphin angreifen. Injektionen bereits kleiner Dosen dieser Substanzen in das Ventrikelsystem (VS) morphinabhängiger Tiere verschiedener Spezies (Rhesusaffen, Kaninchen) lösten nahezu alle auch durch periphere Gabe von Antagonisten provozierbaren Entzugssymptome aus (Eidelberg und Barstow, 1971; Herz et al., 1972). Diese Befunde lassen darauf schließen, daß vor allem periventrikuläre Strukturen bei der Entwicklung der physischen Abhängigkeit von Opiaten eine Rolle spielen. Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit an einem häufig verwendeten Versuchstier, der Ratte, versucht, die als Angriffspunkte in Frage kommenden Strukturen näher zu lokalisieren. Um festzustellen, ob es neben zentralen auch periphere primäre Wirkungsorte gibt, wurde das nach systemischer Applikation von hydro- und lipophilen Antagonisten provozierte Entzugssyndrom mit dem intraventrikulär auslösbaren Syndrom verglichen. (Während hydrophile Substanzen die Blut-Hirn-Schranke nur schwer überwinden, dringen lipophile Pharmaka nach systemischer Applikation sehr schnell in das Gehirn ein.) Zur genaueren Lokalisation der zentralen Angriffspunkte diente die Mikroinjektionstechnik, mittels derer sich kleine Volumina von Antagonistenlösung in bestimmte Hirnareale injizieren lassen, und vor allem die von Albus (1971) am Kaninchen entwickelte Ventrikelabgrenzungsmethode. Mit dieser Technik kann man Antagonisten in die abgegrenzten rostralen und kaudalen Abschnitte des VS injizieren und so in Frage kommende periventrikulär lokalisierte Angriffspunkte näher eingrenzen.

MATERIAL UND METHODE

Die Versuche wurden an männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Anfangsgewicht von durchschnittlich 170 g durchgeführt (Fa. Jautz, Kissleg). Je 5 Tiere (Wasser und Futter ad lib) wurden zusammen in einem Käfig gehalten.

Die Abhängigkeit wurde durch Implantation von Morphin-Depot-Tabletten unter die Rückenhaut der Tiere erzeugt. Diese Applikationsweise gewährleistet einen konstanten Absorptionsstrom des Morphins. Eine Standardtablette (Pellet) enthielt 75 mg Morphinbase, 0.75 mg Silikondioxyd, 75 mg mikrokristalline Zellulose und 1.5 mg Kalziumstearat (s.a. Way et al., 1969).

Um einen 'mittleren' Abhängigkeitsgrad zu erzeugen, erhielten die Tiere 6 Pellets innerhalb von 10 Tagen ('6/10 Gruppe'), und zwar am ersten Tag ein Pellet, am vierten Tag zwei und am siebten Tag drei Pellets. Drei Tage nach der letzten Pelletimplantation wurde das Entzugssyndrom durch Injektion von Morphinantagonisten provoziert. Nachdem hier ein für schwachen Abhängigkeitsgrad charakteristisches Symptom, das sog. 'writhing' (s.u.), weitgehend fehlt (Bläsig et al., 1973^a), wurde in einer Reihe von Versuchen das Entzugsgeschehen erst 14 Tage nach der letzten Pelletimplantation ausgelöst (Gesamtanzahl der Pellets und Implantationsdaten wie in der Gruppe 6/10). Auf diese Weise war es möglich, das Symptom writhing häufiger auszulösen.

1. Entzugsbeobachtung und Erfassung der Symptome

Während des Entzugsexperiments saßen die Ratten einzeln in Acrylglaskäfigen (Grundfläche 17 x 22 cm; Höhe 23.5 cm). Bevor der Antagonist injiziert wurde, wurden die Tiere 10 Minuten lang beobachtet. Die Beobachtungsdauer des Entzugssyndroms betrug 30 Minuten. Die 30-Minuten-Periode war in 10-Minuten-Intervalle unterteilt.

Die beobachteten Symptome ließen sich nur zum Teil quantitativ erfassen. Einige Symptome wurden daher nur einmal in jedem 10-Minuten-Intervall abgefragt, während bei den übrigen Symptomen jedes Ereignis gezählt wurde. Die Termini für die Bezeichnung der einzelnen Abstinenzzeichen entstammen der angelsächsischen Literatur und werden, weil üblicherweise so verwendet, im Text meist unübersetzt zitiert. Zu den gezählten Symptomen gehörten:

exploring (erkunden)

Als exploring wurde jeweils gewertet: Graben im Spreu, Aufstellen an der Käfigwand, Erklettern des Käfigrandes.

jumping (Springen)

Sprung auf den Käfigrand.

teeth chattering (Zähneklappern)

Hörbares, einige Sekunden anhaltendes Zähneklappern wurde als einmaliges teeth chattering gewertet.

wet dog shaking (Schütteln)

Schütteln des Kopfes und Rumpfes 'wie ein nasser Hund'.

writhing (Strecken)

Seitliches Krümmen mit darauffolgendem Strecken des Rumpfes.

flyng (Fliegen)

Ein sehr kräftiger, weiter Sprung (bis zu 2 m) aus dem Käfig, ohne den Käfigrand dabei zu berühren.

Abgefragt, d.h. lediglich alle 10 Minuten einmal auf ihr Vorhandensein geprüft (maximal erreichbare Anzahl der Ereignisse ('score') = 3), wurden folgende Symptome:

scream on touch (Piepsen)

Das Tier piepst bei Berührung.

chewing (Kauen)

Deutliche (mahlende) Kaubewegungen.

ptosis (Ptosis)

Geschlossene Augen.

eye twitching (Augenzwinkern)

Das Tier zwinkert mehrmals im Verlauf einer 10-Minuten-Beobachtungsperiode mit den Augen.

rhinorrhea (Nasenfluß)

Das Wort 'rhinorrhea' wird in dem vorliegenden Text abkürzend auch für die folgenden sekretorischen Symptome verwendet:

salivation (Speichelfluß)

chromodacryorrhea (roter Tränenfluß)

diarrhea (Durchfall)

Weicher, ungeformter Stuhl.

2. Systemische Injektionen

Systemisch wurden die Substanzen mittels intraperitonealer (i.p.) Injektionen verabreicht. Das Injektionsvolumen betrug dabei 0.2 ml/100 g Tiergewicht. Die Kontrolltiere erhielten i.p. Injektionen von 0.9 %iger physiologischer Kochsalzlösung gleichen Volumens.

3. Intracerebrale Injektionen

Die Applikation der Substanzen erfolgte

1. in den Seitenventrikel (i.ventr.)
2. in abgegrenzte Abschnitte des VS und
3. durch Mikroinjektion in verschiedene Kerngebiete.

Die für diese Experimente verwendeten Messingführungskanülen wurden 12 bis 14 Tage vor dem Entzugsexperiment chronisch in bestimmte Gehirngebiete oder Abschnitte des VS implantiert. Sie wurden mit Hilfe eines kleinen Gewindes am Schaft der Kanüle gut in der Schädeldecke verankert und auf ihr noch zusätzlich mit Dentalzement befestigt. Die Koordinaten für die Injektionen in die verschiedenen Areale, errechnet nach König und Klippel (1963) bzw. Zeman und Innes (1963), sind in Tabelle 1 aufgeführt. Als Kontrollen dienten morphinabhängige Tiere, denen i. ventr., in abgegrenzte Abschnitte des VS oder mittels Mikroinjektion 0.9 %ige physiologische Kochsalzlösung verabreicht wurde, und zwar gleiche Volumina wie den jeweiligen Versuchstieren.

Tabelle 1

Koordinaten für Injektionen von Morphinantagonisten in verschiedene Abschnitte des VS und bestimmte Hirnareale morphinabhängiger Ratten (berechnet nach dem Atlas von König und Klippel (1963) bzw. Zeman und Innes (1963)).

Injektionsort	ventral* (mm)	lateral (mm)	rostro-kaudal* (mm)
Seitenventrikel	5	2	1 cB**
4. Ventrikel	6.5 - 7.5	0	3 cL
Aquaedukt (Plombe)	5	0	0.5 cL
Nucleus caudatus putamen	6	2.5 - 3.5	0 - 1 rB
mediale Thalamus- kerngebiete	6 - 7	0 - 1	3 - 4 rL
laterale Thalamus- kerngebiete	6 - 7	2 - 3	3 - 4 rL
mediale Kerngebiete des Mittelhirns	6 - 8	0	0.5 - 1 cL
laterale Kerngebiete des Mittelhirns	6 - 8	1.5 - 2.5	0.5 - 1 cL
Fossa rhomboidea	8	0	2 cL

* gemessen ab der dorsalen Oberfläche der Schädeldecke

**r = rostral; c = kaudal; B = Bregma; L = Lambda

3.1. I.ventr. Injektionen

Nach Injektion in das Vorderhorn des Seitenventrikels (siehe Abb.1) konnte sich Lösung im gesamten VS ausbreiten. Das Injektionsvolumen betrug dabei 25 μ l. Routinemäßige Injektionen 1 %iger Trypanblaulösung nach dem Entzugsexperiment, d.h. 30 Minuten post injectionem (p.i.), dienten dazu, die Substanzausbreitung zu prüfen. Es wurden nur die Experimente ausgewertet, bei denen im gesamten VS Farblösung nachzuweisen war.

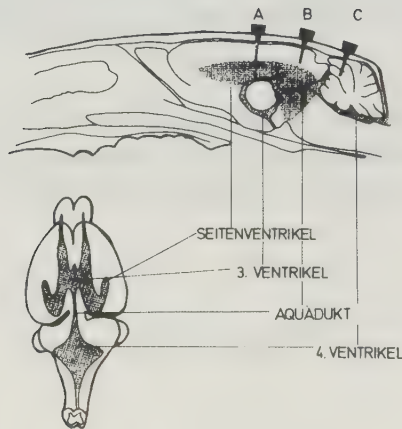


Abb.1: Schematische Darstellung des VS der Ratte sowie Lage der chronisch implantierten Führungskanülen

Oben : Seitenansicht

Unten: Aufsicht

A Führungskanüle für Injektionen in den Seitenventrikel. Von dort breitet sich die injizierte Substanz im gesamten VS aus.

B Führungskanüle für die Injektion der Eucerinplombe in den Aquaedukt.

C Führungskanüle für Injektionen in den 4. Ventrikel.

Kanülenarrangement AB: Anordnung für die Applikation der Antagonisten in die abgegrenzten rostralen Abschnitte des VS.

Kanülenarrangement BC: Anordnung für die Applikation der Antagonisten in den nach rostral abgegrenzten 4. Ventrikel (Jeweilige Substanzausbreitung siehe Text).

3.2. Ventrikelabgrenzungsversuche

Für diese Versuche mußte eine am Kaninchen entwickelte Methode (Albus, 1971; Herz et al., 1972) auf die Ratte übertragen werden. Die Versuchsanordnung war dabei folgendermaßen: Zwei Führungskanülen wurden chronisch in das Gehirn implantiert (s. Abb. 1). Die eine der beiden Kanülen diente dazu, eine Eucerinplombe von 10 bis 20 μ l Volumen in den Aquaeductus mesencephali zu injizieren. Anschließend wurde durch die zweite Kanüle die Substanzlösung (10 μ l) in die abgegrenzten rostralen oder kaudalen Abschnitte des VS appliziert. Nach Injektion in die abgegrenzten rostralen Abschnitte des VS konnte sich die Substanz in den beiden Seitenventrikeln und im 3. Ventrikel ausbreiten. Nach Injektion in den abgegrenzten 4. Ventrikel gelangte die Substanzlösung in den Bereich des kaudalen Aquaeductus und des 4. Ventrikels sowie über die Foramina Luschkae und das Foramen Magendie in den Subarachnoidalraum. Die Koordinaten für die Lage der Injektionskanülen sind in Tab. 1 aufgeführt. Zwischen der Injektion der Eucerinplombe und der des Antagonisten lag ein Intervall von 10 Minuten. Die Beobachtung der Tiere in diesem Zeitraum sollte zeigen, inwieweit die Eucerinplombe das Verhalten der Tiere beeinflusste. Zur Prüfung der Substanzausbreitung wurde 1 %ige Trypanblaulösung unmittelbar nach dem Entzugsexperiment injiziert. Es wurden nur Versuche ausgewertet, bei denen die Farbstoffausbreitung einen korrekten Sitz der Plombe anzeigte und das Verhalten der Tiere nach Injektion der Eucerinplombe unverändert war.

3.3. Mikroinjektionen

Mit Hilfe einer Mikrospritze (Marke Hardo, 0.5 ml) und eines Mikrotriebs (Typ 55 0 10, Nr. 162 der Fa. B. Braun, Melsungen) wurde die Substanzlösung (1 μ l) in die verschiedenen Hirnareale injiziert. Die Injektionsnadel (Marke Hona, Nr. 18) überragte die Führungskanüle um durchschnittlich 1 mm. Ein dünner, ca. 15 cm langer PVC-Schlauch verband die Injektionskanüle mit der am Mikrotrieb befestigten Spritze. Durch Beobachtung einer Luftblase im Verbindungsschlauch wurde kontrolliert, ob mit Sicherheit Substanzlösung aus der Nadelöffnung in das Gewebe gelangt war. War die Nadelöffnung verstopft, so bewegte sich die Luftblase nicht um die vorher geeichte Weglänge weiter. 30 Minuten p.i. wurden die Tiere mit Äther getötet, die Gehirne entnommen und in 4 %igem Formalin aufbewahrt. Nach einem an der Einstichstelle transversal durch das Gehirn gelegten Schnitt konnte man den

Stichkanal erkennen und den Sitz der Kanüle dann unter dem Stereo-Binokular bei ca. 12-facher Vergrößerung nach dem Atlas von König und Klippel (1963) bestimmen. Zur Identifikation der Injektionsstellen in die Fossa rhomboidea diente der Atlas von Zeman und Innes (1963). Der tiefste, noch erkennbare Punkt der Läsion galt als der Injektionsort. Bei den Mikroinjektionen in das Mittelhirn und die Rautengrube wurde wegen der Schwierigkeiten, den Stichkanal hier eindeutig zu erkennen, im Anschluß an das Entzugsexperiment 1 μ l 1 %ige Trypanblaulösung injiziert und der Farbpunkt makroskopisch als Injektionsstelle identifiziert. In jeder Versuchsserie wurden einzelne Gehirne zusätzlich histologisch untersucht. In diesen Fällen wurde der die Injektionsstelle enthaltende Gewebestück in Paraffin eingebettet und in Serien geschnitten. Im Bereich des Stichkanals wurden 9 bis 15 Schnitte alternativ mit Hämatoxylin-Eosin und Kresylviolett gefärbt.

Der Vergleich beider Methoden zur Identifikation der Injektionsstelle zeigte eine befriedigende Übereinstimmung. Es war im Rahmen der Fragestellung daher nicht erforderlich, jedes Gehirn in Serienschnitten aufzuarbeiten.

3.4. Versuche mit ^3H -Levallorphan

Um genauere Informationen über die Ausbreitung der Antagonisten zu erhalten, wurden sowohl die Mikroinjektions- als auch die Ventrikelabgrenzungs-Versuche durch Experimente mit ^3H -Levallorphan (spezifische Aktivität 44 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) ergänzt. Hierbei wurden die Mikroinjektionen in mediale thalamische Kerngebiete bei gleichem Injektionsvolumen und identischen Koordinaten wiederholt (Dosis 25 μg). Außerdem wurden bilaterale Injektionen (Injektionsvolumen 1 μl , Dosis 25 μg) in den Nucleus caudatus putamen durchgeführt (Koordinaten siehe Tab.1). Um festzustellen, in welchem Ausmaß Substanz aus den rostralen Abschnitten des VS trotz der im Aquaedukt liegenden Eucerinplombe in die kaudalen Ventrikelbereiche gelangt, wurden 25 μg ^3H -Levallorphan bei plombiertem Aquaedukt in den Seitenventrikel injiziert. Das Entzugsgeschehen wurde in diesen Versuchen 15 Minuten lang beobachtet. Unmittelbar danach wurde den Tieren in Äthernarkose Liquor cerebrospinalis aus der Cisterna cerebellomedullaris entnommen. Jeweils 10 μl des gewonnenen Liquors wurden mit 10 ml 'Dimilume' (Packard Instrument Company, Frankfurt) versetzt und im Beckmann Scintillationszähler LS 150 auf Radioaktivität untersucht. Zur Kontrolle wurden Liquorproben unbehandelte Tiere mitgemessen.

4. Morphinantagonisten

Die in diesen Untersuchungen verwendeten Antagonisten waren:

Levallorphan tartrat, ^3H -Levallorphan tartrat (Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel)

Naloxon-HCl (Endo Laboratories Garden City, New York)

Diallyl-nor-morphinium-bromid (C.H. Boehringer Sohn, Ingelheim)

Nalorphin-HCl (C.H. Boehringer Sohn, Ingelheim) und

SH 254 (N-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-5-methyl-benzomorphan

(Schering A.-G., Berlin).

Alle angegebenen Dosen wurden nach dem Gewicht der freien Base errechnet.

5. Statistische Tests

Als Signifikanztests dienten der Mann-Whitney- und der Fisher-Exakt-Test.

C. ERGEBNISSE

1. Entzugsprovokation durch Levallorphan

1.1. Entzugsprofil nach intraperitonealer Injektion

An Versuchstieren mittleren Abhängigkeitsgrades (6/10 Gruppe) wurde zunächst durch i.p. Injektion des Antagonisten Levallorphan das Entzugssyndrom ausgelöst und quantitativ erfaßt. Aus Abb.2 geht hervor, daß sich die meisten gezählten Symptome hervorrufen ließen. Eine Ausnahme bildete das Symptom 'flying' (nicht abgebildet). Dieses Abstinenzzeichen entwickelt sich entweder erst bei stärkeren Antagonistendosen als den hier verwendeten oder bei höherem Abhängigkeitsgrad.

Auch das Symptom 'writhing' trat in diesen Versuchen nur selten auf und nahm als rezessives Symptom erwartungsgemäß bei der höchsten Dosis (8 mg/kg) signifikant an Häufigkeit ab ($P < 0.05$).

Die abgefragten Symptome entwickelten sich nach i.p. Injektion des Antagonisten unterschiedlich. Wie man auf Abb.3 sieht, war die Diarrhoe bereits mit der niedrigsten i.p. applizierten Dosis (0.031 mg/kg) maximal auslösbar. Dagegen erreichten scream on touch, chewing, ptosis und eye twitching ihre Maximalwerte erst ab 0.5 mg/kg. Die unter dem Begriff 'rhinorrhea' zusammengefaßten sekretorischen Symptome konnten nur durch die höchste Dosis erstmals bei mehr als 50 % der Tiere induziert werden.

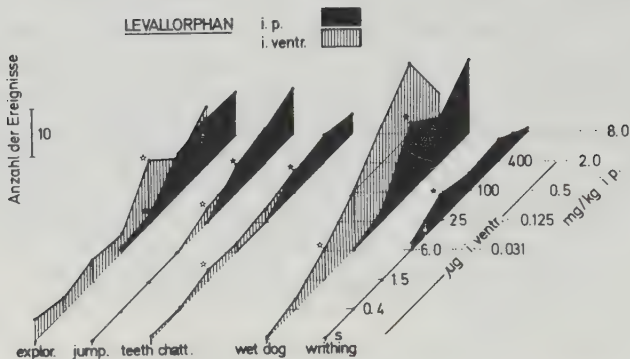


Abb.2: Gezählte Entzugssymptome nach i.ventr. und i.p. Injektion von Levallorphan bei Ratten mit 'mittlerem' Abhängigkeitsgrad (6/10 Gruppe). Ordinate: Anzahl der Ereignisse innerhalb 30 Min. nach Applikation des Antagonisten. Schräge Abszisse: i.ventr. (μg), bzw. i.p. (mg/kg) applizierte Dosen. Korrespondierende Dosen für beide Applikationsweisen sind auf der gleichen Achse aufgetragen (zugrunde gelegt ist ein Körpergewicht von 200 g/Tier). Gestreifte Flächen: i.ventr. Injektion; dunkle Flächen: i.p. Injektion. s: Kochsalzkontrollen. Der Wert, bei dem erstmals 50 % der Tiere das jeweilige Symptom zeigen, ist mit einem Stern gekennzeichnet (☆: i.ventr., ★ i.p.). Jeder Meßpunkt gibt den Mittelwert aus mindestens 12 Versuchen wieder.

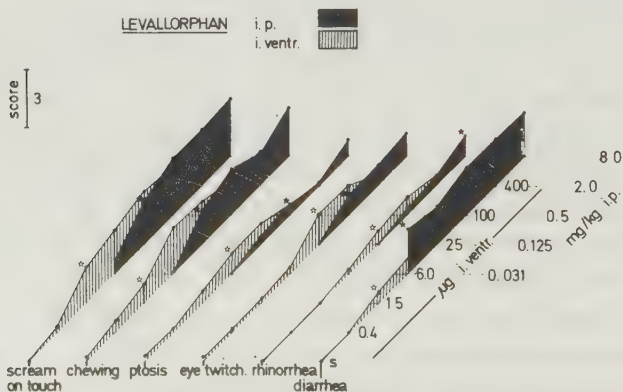


Abb.3: Abgefragte Entzugssymptome nach i.ventr. und i.p. Injektion von Levallorphan. Ordinate: Innerhalb 30 Min. nach Applikation des Antagonisten erreichte Maßzahl (score). Da das Symptom innerhalb der 30-Min.-Periode in jedem 10-Min.-Intervall einmal abgefragt wird, ist der höchst erreichbare score = 3. Unter der Bezeichnung 'rhinorrhea' sind die Symptome Nasenfluß (rhinorrhea), Speichelfluß (salivation) und roter Tränenfluß (chromodacryorrhea) zusammengefaßt. Weitere Erklärungen s. Abb.2.

1.2. Vergleich des Entzugsprofils nach systemischer und zentraler Applikation

Als nächstes mußte geklärt werden, inwieweit sich diese Symptome auch bei i.ventr. Applikation kleiner Antagonistendosen auslösen lassen. Dazu wurde der Entzug durch i.ventr. Gabe von Levallorphan provoziert. Das so erzeugte Abstinenzsyndrom wurde mit dem nach systemischer Injektion hervorgerufenen Syndrom verglichen.

Abb.2 zeigt das Ergebnis für die gezählten Symptome. Auf der Abszisse sind jeweils die bei beiden Applikationsweisen unter Zugrundelegung eines Körpergewichts von durchschnittlich 200 g einander entsprechenden Dosen aufgetragen, wodurch ein direkter Vergleich der erzielten Wirkungen möglich ist. Offensichtlich lassen sich sämtliche Symptome auch durch i.ventr. Applikation auslösen. Eine Ausnahme bildete writhing, das bei diesem Abhängigkeitsgrad auch nach zentraler Applikation des Levallorphans nur selten hervorzurufen war (s.u.). Ein ganz anderes Bild bietet das Symptom wet dog. Es entwickelte sich kräftig bereits bei kleinen Dosen (1.5 ug). Eine ähnliche Wirksamkeit entfaltete sich nach peripherer Gabe erst bei etwa 50-fach höheren Dosen. Ähnliches konnte man bei dem Symptom teeth chattering beobachten, das nach zentraler Gabe von 1.5 ug Levallorphan bereits bei 50 % der Tiere ausgelöst wurde, bei systemischer Applikation dagegen erst durch die Dosis 0.5 mg/kg. Weniger klar ist das Bild für jumping. Es ließ sich zwar, wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, zentral ebenfalls bereits durch kleine Dosen auslösen, blieb aber im Niveau niedrig. Um festzustellen, ob diese niedrige jumping-Rate etwa darauf zurückzuführen ist, daß bei dem Injektionsvolumen von 25 ul kaudale Abschnitte des VS nicht erreicht werden, wurde bei einer Versuchsreihe mit 25 ug Levallorphan das Injektionsvolumen von 25 ul auf 50 ul erhöht. Zwar konnte daraufhin eine Tendenz zu stärkerem jumping beobachtet werden, der Unterschied war aber nach dem Mann-Whitney-Test statistisch nicht signifikant (Tab.2). Diese Tabelle zeigt auch, daß bei Applikation von Levallorphan in das gesamte VS jumping nur bei einem Teil der Tiere auslösbar ist (siehe später).

Tab.2:

Vergleich der jumping-Häufigkeit morphinabhängiger Ratten nach Applikation verschieden großer Volumina Levallorphanlösung (25 ug).

jumping-Häufigkeit

50 ul	25 ul
1	1
2	0
1	0
0	0
0	0
0	3
29	0
2	12
23	0
	0
	10
	11
$\bar{X} = 6.4$	$\bar{X} = 3.0$

Die abgefragten Symptome (Abb.3) verhalten sich ähnlich wie die gezählten Symptome. Fast alle ließen sich nach i.ventr. Injektionen niedriger Dosen im gleichen Maße wie nach i.p. Gabe bedeutend höherer Dosen hervorrufen. Lediglich die Diarrhoe erreichte bei keiner der i.ventr. verabfolgten Dosen das durch periphere Applikation des Antagonisten auslösbare Niveau, obwohl auch sie bereits im niedrigen Dosisbereich (1.5 ug) bei 50 % der Tiere auftrat. Einzelne Symptome wie die sekretorischen Zeichen und Ptosis, waren bei beiden Applikationsweisen verhältnismäßig schwach ausgeprägt.

2. Entzugsprovokation durch Diallyl-nor-morphin und Nalorphan

Die Versuche mit Levallorphan zeigten für Symptome wie z.B. wet dog shaking, teeth chattering oder scream on touch Unterschiede äquipo-tenter Dosen von mehr als einer Zehnerpotenz. Aus diesem Unterschied kann geschlossen werden, daß der Antagonist den Wirkungsort unmittelbar vom VS her erreicht (siehe Diskussion). Bei einer Reihe anderer Symptome war das Bild weniger klar. Deshalb wurde in weiteren Versuchsreihen eine Substanz mit quarternärer Ammoniumstruktur appliziert.

die wegen ihrer fehlenden Lipoidlöslichkeit nur schwer die Blut-Hirn-Schranke passiert: Das quaternäre Nalorphinanalog Diallyl-nor-morphin.

Abb.4 zeigt die Dosiswirkungskurven dieser Substanz für die gezählten Symptome nach i.p. und i.ventr. Administration. Der Unterschied zwischen beiden Applikationsweisen ist offensichtlich. Nach systemischer Injektion sind für die meisten Symptome etwa 1000-fach höhere Dosen erforderlich, um eine der zentralen Applikation etwa entsprechende Wirksamkeit zu erzielen. Das gilt auch für jumping, das allerdings im Niveau - wie bereits in den Versuchen mit Levallorphan - niedrig blieb. Eine Ausnahme bildete wieder writhing, das sich zentral nicht auslösen ließ.

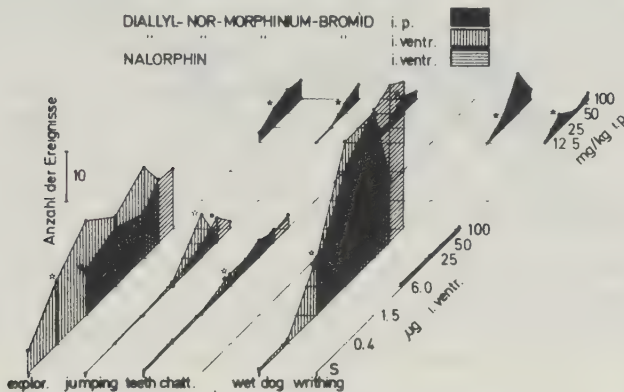


Abb.4: Gezählte Entzugssymptome nach Applikation des quaternären Morphinantagonisten Diallyl-nor-morphin (i.ventr. und i.p.) bzw. der analogen tertiären Substanz, Nalorphin (i.ventr.) bei Ratten mit mittlerem Abhängigkeitsgrad (6/10 Gruppe). Vertikal gestreifte Flächen: i.ventr. Injektion von Diallyl-nor-morphin. Horizontal gestreifte Flächen: i.ventr. Injektion von Nalorphin. Dunkle Flächen: i.p. Injektion von Diallyl-nor-morphin. s: Kochsalzkontrollen. Der Wert, bei dem erstmals 50 % der Tiere das jeweilige Symptom zeigen, ist mit einem Stern gekennzeichnet:

- ☆ Diallyl-nor-morphin i.ventr.
- ★ " " i.p.
- ✱ Nalorphin i.ventr.

Jeder Meßpunkt gibt den Mittelwert aus mindestens 12 Versuchen wieder (weitere Erklärungen s.Abb.2).

Der Befund für die abgefragten Abstinenzzeichen (Abb.5) ist ähnlich. Auch hier liegt das Verhältnis äquipotenter Dosen (i.ventr./i.p. Applikation) bei den meisten Symptomen in der Größenordnung 1:1000. Lediglich einige Entzugszeichen, vor allem die Diarrhoe, machen eine Ausnahme. Letzteres Symptom ließ sich nach zentraler Gabe selten und bei nur wenigen Tieren auslösen. Allerdings war die Diarrhoe auch nach systemischer Applikation sehr schwach ausgeprägt.

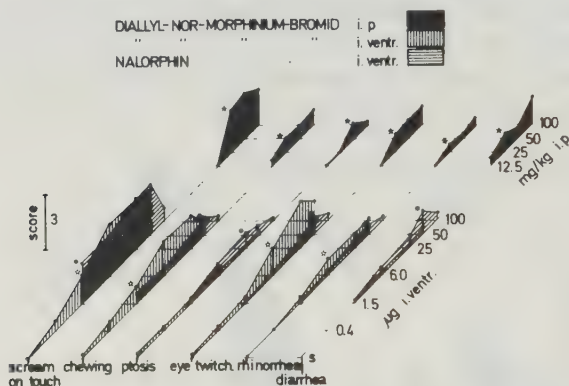


Abb.5: Abgefragte Entzugssymptome nach Injektion von Diallyl-nor-morphin bzw. Nalorphin. Ordinate: erreichte Maßzahl (score) innerhalb 30 Min. nach Applikation des Antagonisten. Unter der Bezeichnung 'rhinorrhoea' sind die Symptome Nasenfluß, Speichelfluß und roter Tränenfluß zusammengefaßt (weitere Erklärungen s.Abb.3 u.4).

In Abb.4 und 5 sind auch die Ergebnisse nach i.ventr. Injektion von Nalorphin, dem tertiären Analog von Diallyl-nor-morphin, dargestellt. Offensichtlich ist Nalorphin ähnlich effektiv wie die quarternäre Substanz (bei einigen Symptomen, darunter jumping, ist eine Tendenz zu schwächerer Wirksamkeit festzustellen). Vergleicht man das Auftreten der Abstinenzzeichen innerhalb der drei 10-Minuten-Perioden, so findet man, daß auch der Zeitverlauf für die Entwicklung der Symptome bei beiden Substanzen ähnlich ist (nicht abgebildet).

Diese Ergebnisse interessieren vor allem in Bezug auf die unterschiedliche Rezeptor-Affinität der beiden Antagonisten (siehe Diskussion).

Die bisher beschriebenen Experimente geben keinen Aufschluß über den Ursprungsort des Entzugssymptoms writhing, da bei Tieren mit mittlerem Abhängigkeitsgrad (6/10) writhing ohnehin nicht häufig zu beobachten ist (siehe auch Bläsig et al., 1973). Deshalb wurde der Entzug bei einer Reihe von Tieren 14 statt 3 Tage nach der letzten Pellet-implantation provoziert (siehe Material und Methode). Auf diese Weise war es möglich, einen niedrigen Abhängigkeitsgrad mit vergleichsweise hoher writhing-Rate zu erzeugen.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigt Abb.6. I.ventr. Applikation von Diallyl-nor-morphin löste zwar wet dog shaking, aber kein writhing aus. Dagegen konnte man nach systemischer Gabe des Antagonisten nur noch writhing beobachten, während wet dog nahezu vollständig fehlte. Allerdings wurden i.p. höhere Dosen zur Provokation von writhing benötigt, als bei Annahme eines peripheren Wirkungsortes für dieses Symptom zu vermuten war. Deshalb wurden systemisch niedrigere Dosen von Nalorphin, dem tertiären Analog von Diallyl-nor-morphinium-bromid, verabreicht, das wegen seiner guten Lipoidlöslichkeit leicht die Blut-Hirn-Schranke passiert. Die Ergebnisse demonstrieren, daß deutlich niedrigere Dosen dieses Antagonisten das Symptom writhing noch bei ca. 50 % der Tiere auslösen konnten (siehe Diskussion).

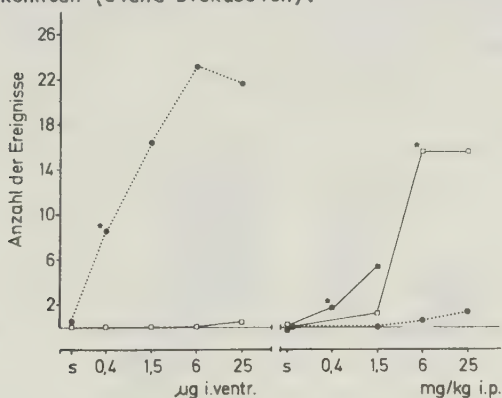


Abb.6: Entzugssymptome writhing und wet dog shaking nach Injektion von Diallyl-nor-morphin (i.ventr. und i.p.) bzw. Nalorphin (i.p.) bei Ratten mit schwachem Abhängigkeitsgrad (die Tiere erhielten 6 Morphin-Standardtabletten (Pellets) innerhalb von 10 Tagen; der Entzug erfolgte 14 Tage nach der letzten Pelletimplantation). writhing, ausgelöst durch Diallyl-nor-morphin □ bzw. Nalorphin —●—; wet dog shaking, ausgelöst durch Diallyl-nor-morphin● wet dog shaking, ausgelöst durch Nalorphin —●—. s: Kochsalzkontrollen. Der Wert, bei dem erstmals 50% der Tiere

das jeweilige Symptom zeigen, ist mit einem Stern gekennzeichnet. Jeder Meßpunkt gibt den Mittelwert aus mindestens 11 Versuchen wieder.

3. Entzugsprovokation durch SH 254

Nach i.ventr. Gabe der bisher verwendeten Antagonisten entwickelte sich das Symptom jumping nur schwach. Um weitere Informationen über dieses wichtige Entzugssymptom zu erhalten, wurden Experimente mit dem Benzomorphanderivat SH 254 (N-(2-hydroxy-2-methylpropyl)-5-methylbenzomorphan) durchgeführt. Mit SH 254 läßt sich i.p. das Symptom jumping sehr viel besser auslösen als mit anderen Antagonisten (Bläsig et al., in Vorbereitung). Diese nach i.p. Applikation des SH 254 von Bläsig et al. beobachtete Symptomentwicklung wird in Abb.7 eigenen, nach i.ventr. Injektion der Substanz erhaltenen Befunden gegenübergestellt.

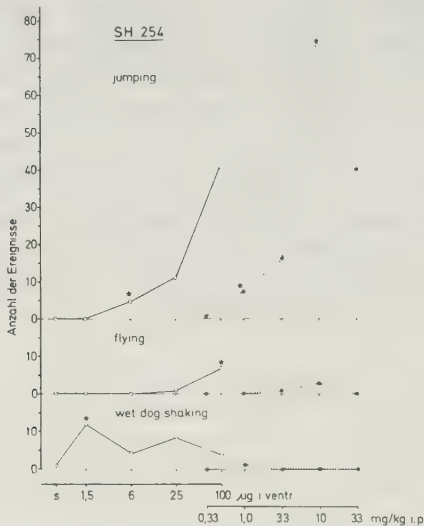


Abb.7: Entzugssymptome jumping, flying und wet dog shaking nach i.p. und i.ventr. Injektion des Benzomorphanderivates SH 254 bei Ratten mit mittlerem Abhängigkeitsgrad (6/10 Gruppe). Abszisse: i.ventr.(μ g) bzw. i.p. (mg/kg) applizierte Dosen (zugrundegelegt ist ein Körpergewicht von 200 g/Tier). Ordinate: Anzahl der Ereignisse innerhalb 30 Minuten nach Injektion des Antagonisten. ○—○ i.ventr., ●—● i.p. Injektion. s: Kochsalzkontrollen. Der Wert, bei dem erstmals 50 % der Tiere das jeweilige Symptom zeigen, ist mit einem Stern gekennzeichnet. Jeder Meßpunkt gibt den Mittelwert aus mindestens 10 Versuchen wieder.

Man sieht, daß auch i.ventr. Applikation von SH 254 häufiges jumping provoziert, und zwar bereits bei deutlich niedrigeren Dosen als nach i.p. Gabe. Das zeigt, daß auch mit dieser Applikationsweise von Antagonisten hohe jumping-Raten erreicht werden können (siehe Diskussion). Interessanterweise ließ sich wet dog shaking ebenfalls durch i.ventr. Applikation von SH 254 hervorrufen, obwohl das Symptom nach i.p. Injektion dieses Antagonisten kaum auszulösen war.

4. Ventrikellabgrenzungsversuche

Nachdem nahezu das gesamte Spektrum der Entzugssymptome durch niedrige i.ventr. applizierte Dosen ausgelöst werden konnte (und damit deren zentraler Ursprung gesichert war), lag es nahe zu fragen, welche der vermutlich ventrikelnahen Strukturen dafür verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurde eine von Albus 1971 am Kaninchen entwickelte Methode, durch eine in den Aquaedukt gesetzte Lucerinplombe den 4. Ventrikel gegen den 3. Ventrikel abzuschließen, auf die Ratte übertragen (siehe Material und Methode). Damit war es möglich, in abgegrenzte Teile des Ventrikelsystems Substanzen zu applizieren.

In Abb.8 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt. Gelangte der Antagonist nur in Seitenventrikel und 3. Ventrikel, so kam es zu einem lediglich schwachen Entzugsbild mit dem Symptom wet dog shaking als hauptsächlichem Ereignis. Jumping und teeth chattering waren erst durch 25 µg bei 50 % der Tiere auszulösen und blieben im Niveau niedrig. Das Symptom flying fehlte bei dieser Versuchsanordnung ganz.

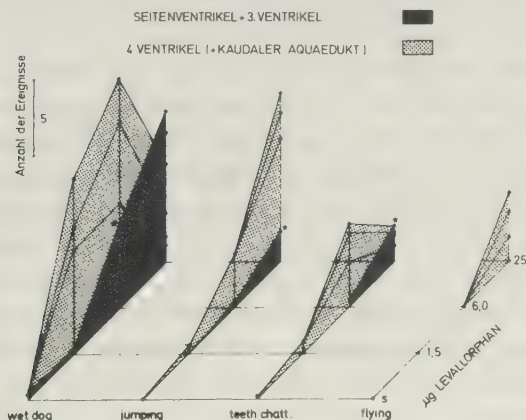


Abb.8: Gezählte Entzugssymptome nach Injektion von Levallophan in abgegrenzte Abschnitte des VS bei Ratten mit mittlerem Abhängigkeitsgrad (6/10 Gruppe). Punktierte Flächen: Injektion in den abgegrenzten 4. Ventrikel. Dunkle Flächen: Injektion in die abgegrenzten rostralen Abschnitte des VS. Ordinate: Anzahl der Ereignisse inner-

halb 30 Minuten nach Applikation des Antagonisten. Schräge Abszisse: Dosis des Antagonisten. Die Unterteilungen zeigen die Anzahl der Ereignisse innerhalb jeder der drei 10-Minuten-Intervalle der gesamten Beobachtungsperiode. Der Wert, bei dem erstmals 50 % der Tiere das entsprechende Symptom zeigen, ist mit einem Stern gekennzeichnet:

☆ kaudale Abschnitte des VS
★ rostrale " " "

s: Kochsalzkontrollen. Jeder Punkt gibt den Mittelwert aus 8 Versuchen wieder.

Blieb das Levallorphan dagegen im Bereich des 4. Ventrikels und kaudalen Aquaedukts, so kam es zu einem sehr viel stärkeren Abstinenzsyndrom. Das Symptom jumping, hier bereits durch niedrige Dosen hervorrufbar, erreichte bei 25 ug fünffach höhere Werte als nach Applikation der Substanz in die rostral des Aquaedukts gelegenen Ventrikelbereiche. Bei dieser Dosis zeigten auch 50 % der Tiere flying, ein Symptom, das ein besonders starkes Entzugsge-schehen kennzeichnet. Die Symptome wet dog und teeth chattering ließen sich ebenfalls im niedrigeren Dosisbereich vom 4. Ventrikel aus leichter auslösen als vom 3. Ventrikel. Interessanterweise zeigten diese beiden Symptome bei der höchsten Dosis die Tendenz, wieder abzunehmen, ein Befund, der auch nach Gabe in das gesamte VS bei der höchsten Dosis an einzelnen Symptomen beobachtet und bereits von Bläsig et al. (1973) nach systemischer Applikation von Antagonisten als 'shift' der Symptome beschrieben wurde (vgl. Abb. 3). Offensichtlich ist dieser shift auch bei lokaler Einwirkung der Antagonisten vorhanden.

Abb. 9 zeigt die Befunde für die abgefragten Symptome, die im wesentlichen ähnlich sind. Die bei den gezählten Symptomen festgestellten großen Unterschiede zwischen beiden Versuchsanordnungen in Bezug auf die Ausprägung der einzelnen Symptome sind hier allerdings weniger deutlich. Der Vergleich der Symptomentwicklung bei der niedrigsten applizierten Dosis (1.5 ug) zeigt immerhin, daß die meisten Symptome, die vom 4. Ventrikel aus noch auszulösen sind, nicht mehr auftreten, wenn die Substanz in Seitenventrikeln und 3. Ventrikel bleibt. Damit war auch im Hinblick auf diese Symptome der Effekt der applizierten Substanz im Bereich des 4. Ventrikels am stärksten.

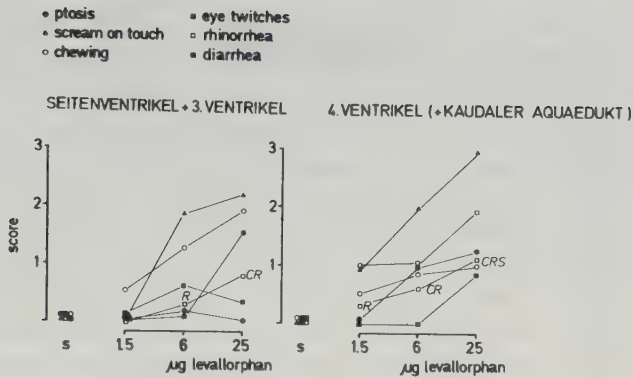


Abb.9: Abgefragte Entzugssymptome nach Applikation von Levallorphan in abgegrenzte Abschnitte des VS bei Ratten mit mittlerem Abhängigkeitsgrad (6/10 Gruppe). Links: Applikation in die abgegrenzten rostralen Abschnitte des VS. Rechts: Applikation in den abgegrenzten 4. Ventrikel. Ordinate: score innerhalb 30 Minuten nach Applikation des Antagonisten (höchster erreichbarer score = 3). Abszisse: Dosis des Antagonisten. Die Symptome Nasenfluß, Speichelfluß und roter Tränenfluß sind unter der Bezeichnung 'rhinorrhea' zusammengefaßt. Das Auftreten jedes dieser drei Symptome wird an der entsprechenden Stelle angezeigt durch R = rhinorrhea, S = salivation und C = chromodacryorrhea. s: Kochsalzkontrollen. Jeder Meßpunkt gibt den Mittelwert aus 8 Versuchen wieder.

Auch bei Applikation des Morphinantagonisten Naloxon ergab sich ein ähnliches Bild (Abb.10): Starke Entzugszeichen wie flying (nicht abgebildet) und jumping traten insbesondere dann auf, wenn sich die Substanz nur im Bereich des 4. Ventrikels und des kaudalen Aquaedukts ausbreitete. Gelangte sie nicht in diese Abschnitte des VS, so kam es wieder zu einem sehr viel schwächeren, vor allem durch das Symptom wet dog shaking charakterisierten Entzugssyndrom. Die Abbildung enthält zum Vergleich auch das Abstinenzgeschehen nach Injektion des Antagonisten in das gesamte VS. Während teeth chattering und wet dog shaking auch nach Gabe in das gesamte VS maximal auslösbar waren, wurden hohe jumping-Raten nur dann gefunden, wenn man die Substanz in den abgegrenzten 4. Ventrikel applizierte. Dort ließen sich auch für die meisten der abgefragten Abstinenzzeichen signifikant höhere scores erzielen, als nach Administration des Naloxons in die rostral des Aquädukts gelegenen Abschnitte (Tab.3).

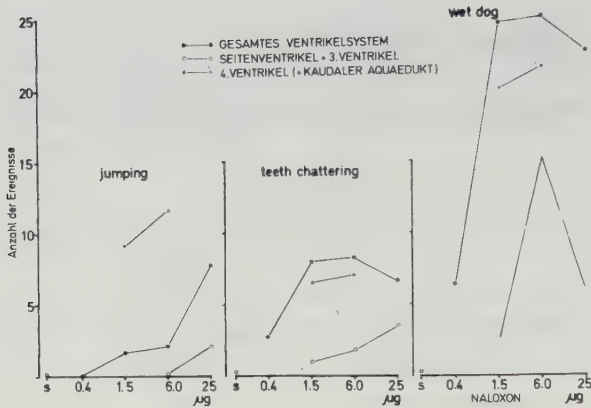


Abb. 10: Entzugssymptome jumping, teeth chattering und wet dog shaking nach Applikation von Naloxon in das gesamte VS und in dessen abgegrenzte rostrale und kaudale Abschnitte bei Ratten mit mittlerem Abhängigkeitsgrad (6/10 Gruppe). ●—● gesamtes VS, ○—○ Seitenventrikel und 3. Ventrikel, ▲—▲ 4. Ventrikel und kaudaler Aquaedukt. Ordinate: Anzahl der Ereignisse innerhalb 30 Minuten nach Applikation des Antagonisten. Abszisse: Dosis des Antagonisten. s: Kochsalzkontrollen. Jeder Punkt gibt den Mittelwert aus 7 bis 8 Versuchen wieder.

Tab.3:

Abgefragte Entzugssymptome nach Injektion von Naloxon in abgegrenzte Abschnitte des VS. Da jedes Symptom einmal innerhalb der drei 10-Minuten-Intervalle der Beobachtungsperiode abgefragt wurde, ist der höchste erreichbare score = 3. 'Rhinorrhoea' steht auch für die Symptome chromodacryorrhoea und salivation.

Anzahl der Tiere (n)	Dosis (ug)	S C O R E					
		scream on touch	chewing	ptosis	eye twitching	rhinor- rhea	diarrhea
Seitenventrikel							
7	1.5	1.6	0.4	0.6	0.4	0.3	0.0
8	6	1.6	0.6	0.9	1.5	0.1	0.5
8	25	2.6	1.4	0.9	1.8	1.3	1.1
4. Ventrikel							
7	1.5	3.0 ⁺	1.7 ⁺	0.3	1.1	0.6	0.9 ⁺
8	6	3.0	2.1	0.7	2.4	1.0 ⁺	1.6

⁺signifikant verschieden (Mann-Whitney-Test, $P < 0.01$) von den Werten, die bei plombiertem Aquaedukt nach Applikation identischer Dosen in den Seitenventrikel gefunden wurden.

In einzelnen Fällen entwickelte sich das Symptom jumping allerdings auch nach Applikation des Antagonisten in den abgegrenzten 4. Ventrikel nur sehr schwach. Die Sektion der Gehirne der betreffenden Tiere zeigte, daß die Eucerinplombe bis in die rostralen Bereiche des 4. Ventrikels vorgedrungen war. Um diesen Befund zu sichern, wurden Versuche mit mehr kaudaler Placierung der Plombe durchgeführt (Eucerin-Injektionskanüle 1-2 mm cL). Bei dieser Versuchsanordnung ließ sich keine starke Wirkung mehr erzielen. Der Effekt war vielmehr ähnlich schwach wie nach Administration in die abgegrenzten rostralen Ventrikelabschnitte. Das galt besonders für die Symptome jumping und flying (s.Tab.4). In diesen Fällen waren nach Injektion der Trypanblaulösung das periaquaeduktale Grau und häufig auch die rostralen Bereiche der Rautengrube nicht angefärbt - im Gegensatz zu den Versuchen mit mehr rostralem Sitz der Plombe, in denen sich der Farbstoff meist bis in die kaudalen Abschnitte des Aquaeducts ausgebreitet hatte.

Tab.4:

Entzugszeichen nach Applikation von Naloxon in den nach rostral abgegrenzten 4. Ventrikel (Eucerin-Kanüle 1-2 mm kaudal von Lambda).

Anzahl der Tiere (n)	Dosis (ug)	Mittlere jumping	Anzahl der Ereignisse teeth chattering	wet dog	flying	S C O R E scream on touch	rhinor-rhea	diar-rhea
4	1.5	0.3	5.5	8.3	0.0	3.0	0.8	2.0
9	6	2.1	5.7	13.3	1.0	3.0	1.7	1.6
7	25	2.3	9.3	1.9	0.3	3.0	2.1	0.9

4.1. Prüfung der Plombendurchlässigkeit mit ³H-Levallorphan

Die Ergebnisse zeigen, daß sich auch in den abgegrenzten rostralen Ventrikelabschnitten ein, wenn auch nur schwaches Entzugsbild auslösen läßt (vgl.Abb.8 und 10). Es galt deshalb zu untersuchen, ob dieser Befund mit Sicherheit auf einen primären Wirkungsort in diesen Gebieten zurückzuführen ist, oder ob etwa Substanz trotz der Plombe in den 4. Ventrikel gelangt und dort die nach Applikation des Antagonisten in die abgegrenzten rostralen Ventrikelabschnitte beobachteten Abstinenzzeichen hervorruft.

Da der routinemäßig verwendete Test mit 1 %iger Trypanblaulösung zu einer genauen Beurteilung der Substanzausbreitung nicht ausreichte, sollten Versuche mit ^3H -Levallorphan diese Frage klären helfen. Dabei wurde geprüft, ob bei plombiertem Aquaedukt in den Seitenventrikel injizierte radioaktive Substanz in dem aus der Cisterna cerebello medullaris entnommenen Liquor nachzuweisen ist und ob eine Korrelation zwischen jeweils gefundener Radioaktivität im Liquor und den ausgelösten Abstinenzzeichen besteht.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefaßt. Bei zwei von fünf Tieren mit plombiertem Aquaedukt wurden hohe Radioaktivitätsmengen im Liquor gefunden (> 90 cpm)*. Hier war die Eucerinplombe offenbar kaum wirksam. Die Werte sind nur wenig niedriger als die, die nach Applikation von 25 ug bei freiem Fluß durch den Aquaedukt im Liquor gemessen wurden.

Tab.5:

Vergleich der Entzugssymptome innerhalb 10 Minuten nach Injektion von ^3H -Levallorphan in den Seitenventrikel mit und ohne Aquaeduktblockade.

Tier Nr.	Dosis (ug/ul NaCl)	Mittlere Anzahl der jumping	wet dog	Ereignisse teeth chattering	*counts per minute (cpm) in 10 ul Liquor
----------	--------------------------	--------------------------------	---------	-----------------------------------	--

Aquaedukt
blockiert

1	25/10	1	9	3	30.9
2		0	5	3	0.2
3		0	1	0	4.7
4		0	7	0	49.0
5		2	7	10	90.3
6		0	5	1	25.5
7		0	17	4	9.0
8		1	8	2	97.2

Aquaedukt
nicht blockiert

1	25/25	21	2	3	68.7
2		3	15	10	129.0
3		1	15	15	109.0
4		0	12	11	128.0
5	1.5/25	0	3	0	30.1
6		0	4	0	47.3
7		0	4	0	32.3
8		0	4	0	15.4

*alle Werte abzüglich des Backgrounds von 17 cpm
(Mittelwert aus Liquorproben unbehandelter Tiere)

Auffallenderweise zeigten diese beiden Tiere das Symptom jumping. Auch bei den anderen Tieren dieser Versuchsgruppe - eine Ausnahme bildete Tier Nr. 2 - trat Substanz durch die Plombe in den 4. Ventrikel über. Die hier gemessenen Aktivitätswerte waren aber deutlich niedriger und entsprachen in etwa denen, die nach Applikation von 1.5 ug in das gesamte Ventrikelsystem nachgewiesen wurden. Auch die Häufigkeit des in dieser Gruppe gefundenen wet dog shaking liegt in der der Dosis 1.5 ug entsprechenden Größenordnung (vgl. auch Abb.3).

Alle diese Versuche zeigen, daß die im Hinblick auf das Auslösen von Entzugssymptomen empfindlichsten Strukturen in der Umgebung des 4. Ventrikels und kaudalen Aquadukts lokalisiert sind. Hier wurden die stärksten Wirkungen erzielt, während es in den abgegrenzten rostralen Abschnitten des VS nur zu schwachen Effekten kam (siehe Diskussion).

5. Intracerebrale Mikroinjektionen

Die Befunde standen in gewissem Widerspruch zu den Ergebnissen von Wei und Mitarbeitern (1972), die auf Grund ihrer Versuche mit Applikation kristallinen Naloxons in verschiedene Kerngebiete des ZNS hauptsächlich den medialen Thalamus als primären Wirkungsort postulierten. Das gab den Anlaß zu eigenen Versuchen mit der Mikroinjektionstechnik.

5.1. Mikroinjektionen mit Levallorphan

Abb.11 zeigt die durch Mikroinjektion von verschiedenen Dosen Levallorphan in bestimmte Hirnareale bewirkte Entzugssymptomatik:

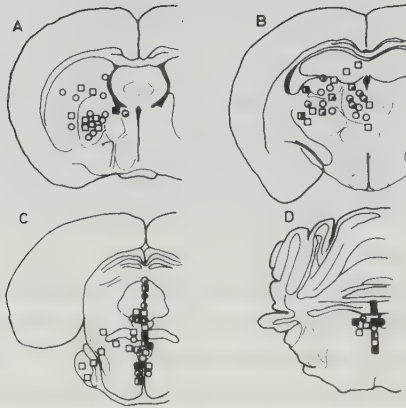


Abb.11: Entzugsgeschehen* innerhalb 10 Minuten nach Mikroinjektion von Levallorphan in verschiedene Kerngebiete des ZNS bei Ratten mit mittlerem Abhängigkeitsgrad (6/10 Gruppe). Die Darstellungen der transversalen Schnittebenen sind dem Atlas von König und Klippel (1963), (A-C), bzw. Zemann und Innes (1963), (D), entnommen.

A: Ebene in Höhe des Nucleus caudatus (Ebene 23, eingetragen sind die Injektionspunkte der Ebenen 18 bis 28).

B: Ebene in Höhe des Thalamus (Ebene 36, eingetragen sind die Injektionsstellen der Ebenen 35 bis 37).

C: Ebene in Höhe des Mittelhirns (Ebene 54, eingetragen sind die Injektionsstellen der Ebenen 51 bis 57).

D: Ebene in Höhe der Brücke (Ebene A 8, eingetragen sind die Injektionsstellen der Ebenen A 7 und A 8).

*Kriterien für die Bewertung des Entzugsbildes:

Wirkung	Dosis Levallorphan		Kriterien
	6 ug	25 ug	
keine	○	□	<2 x wd dog (wd) und/oder teeth chattering (tc)
schwache	◐	◑	2-3 x wd und/oder tc
mäßige	◒	◓	>4 x wd und/oder tc
starke	●	■	jumping
sehr starke	● ⁷	■ ⁷	jumping und flying

Nucleus caudatus putamen (Ebene A)

Unilaterale Injektionen in den Nucleus caudatus putamen lösten nur in zwei Fällen Entzugssymptome aus. Bei beiden Tieren lag die Injektionsstelle in der Nähe des Seitenventrikels. An den übrigen Tieren wurden zwar vereinzelt Reaktionen wie teeth chattering oder wet dog shaking beobachtet. Da jedoch auch nicht abhängige Tiere dieses Verhalten hin und wieder zeigen, kann man dabei nicht unbedingt auf ein Entzugsgeschehen schließen (die Kriterien für die Bewertung der Effekte sind in der Legende zu Abb.10 aufgeführt).

Thalamus (Ebene B)

Ein etwas anderes Bild ergab sich, injizierte man Levallorphan in mediale und laterale Thalamuskerngebiete. Hier konnte von unregelmäßig über den Thalamus verteilten Punkten aus bei etwa der Hälfte der Tiere eine schwache bis mäßige Entzugssymptomatik hervorgerufen werden.

Mittelhirn (Ebene C)

Während Injektionen von Levallorphan in laterale Bereiche des Mittelhirns keine Symptome auslösten, reagierten über die Hälfte der Tiere mit Entzugszeichen, applizierte man die Substanz in ventral des Aquaedukts gelegene mediale Gebiete des Mittelhirns. Dabei kam es auch zu Symptomen wie jumping oder chromodacryorrhea, die charakteristisch für ein starkes Abstinenzgeschehen sind.

Fossa rhomboidea (Ebene D)

Die stärksten Effekte ließen sich nach Applikation von Levallorphan in den Boden des 4. Ventrikels erzielen. Nur bei 25 % der Tiere blieben hier Entzugssymptome aus. 4 von 8 der mit Abstinenzzeichen reagierenden Tiere zeigten das Symptom jumping, eines davon sogar das Symptom flying.

5.2. Mikroinjektionen mit ^3H -Levallorphan

Die Mikroinjektionsversuche führten zu der Frage, warum auch im Zwischenhirn häufiger schwache bis mäßige Effekte ausgelöst wurden. Diese Frage konnte zunächst nicht beantwortet werden, da offenblieb, ob man in den entsprechenden Injektionsstellen primäre Wirkungsorte vermuten konnte, oder ob etwa Substanz durch den Stichkanal in das Ventrikelsystem gelangte und ihre Wirkung dann an dritter Stelle entfaltete. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden die Injektionen in den medialen Thalamus mit ^3H -Levallorphan wiederholt. Die Ergebnisse dieser Versuche veranschaulicht Abbildung 12.

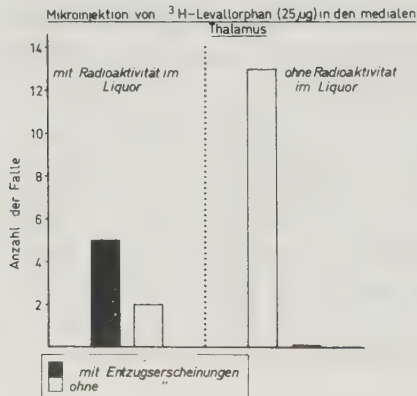


Abb.12: Mikroinjektion von ^3H -Levallorphan in mediale Kerngebiete des Thalamus. Ordinate: Anzahl der Fälle mit bzw. ohne Entzugserscheinungen. Rechts: Ohne Radioaktivität im Liquor cerebrospinalis (< 10 cpm). Links: Mit Radioaktivität im Liquor cerebrospinalis (> 10 cpm). Schwarzer Balken: Fälle mit Entzugserscheinungen; als Kriterium galt das Auftreten von mindestens 3 x wet dog shaking und/oder teeth chattering. Weiße Balken: Fälle ohne Entzugszeichen. Bei den angegebenen Radioaktivitätswerten ist der mittlere Background von 17 cpm bereits subtrahiert.

Keines der Tiere, bei denen die Ausbreitung der Substanz hauptsächlich auf die Injektionsstelle beschränkt blieb (Radioaktivität im Liquor < 10 cpm), zeigte Abstinenzzeichen (vgl. Tab.6). Dagegen reagierten bei Werten über 10 cpm fast 2/3 der Tiere mit Entzugszeichen. (Der Unterschied zwischen den Tieren mit und denen ohne Radioaktivität im Liquor im Hinblick auf das Auftreten von Entzugssymptomen ist nach dem Fisher-Exakt-Test mit $P < 0.005$ statistisch signifikant.)

Tab.6:

Entzugssymptome innerhalb 10 Minuten nach Mikroinjektion von ^3H -Levallorphan in den medialen Thalamus. (Dosis 25 ug/ 1 ul NaCl)

Serie/ Tier Nr.	Mittlere Anzahl der Ereignisse			S C O R E		*counts per minute (cpm) in 10 ul Liquor
	jumping	wet dog	teeth chattering	scream on touch	rhinor- rhea	
tm I/	1	0	0	1	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	5	0	0	17
	6	0	0	0	0	3
	7	0	7	0	1	116
	8	0	11	0	1	120
tm II/	1	0	0	0	1	31
	2	0	0	0	0	13
	3	0	0	0	0	0
tm III/	1	0	0	0	0	3
	2	0	0	1	0	13
	3	0	0	1	0	0
	4	0	0	3	1	102
	5	0	0	4	1	35
	6	0	0	0	0	0
	7	0	0	1	1	5

*alle Werte abzüglich des mittleren Backgrounds von 17 cpm

Ähnliche Befunde ließen sich durch bilaterale Injektionen von ^3H -Levallorphan in den Nucleus caudatus putamen erzielen. Diese Versuche sollten darüber hinaus auch die Frage klären, inwieweit bilaterale Injektion von Levallorphan in dieses Kerngebiet Wirkungen zeitigt.

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse: Nur in zwei Fällen stellte sich ein - schwacher bis mäßiger - Effekt ein. Beide Tiere hatten im Liquor Radioaktivitätswerte von über 10 cpm, während bei allen anderen Tieren die gemessene Radioaktivität 10 cpm nicht überschritt. Auch hier war nach dem Fisher-Exakt-Test mit $P < 0.05$ der Unterschied statistisch signifikant.

Tab.7:

Bilaterale Mikroinjektionen von ^3H -Levallorphan in den Nucleus caudatus putamen. Entzugsgeschehen innerhalb 10 Minuten p.i. (Dosis: 25 ug/ 1 ul NaCl)

Tier Nr.	Mittlere jumping	Anzahl der wet dog	Ereignisse teeth chattering	S C O R E		*counts per minute (cpm) in 10 ul Liquor
				scream on touch	rhinorrhea	
1	0	0	0	0	0	2
2	0	6	8	1	1	20
3	0	0	2	1	1	9
4	0	0	1	0	0	2
5	0	0	5	1	1	39
6	0	0	0	0	0	3
7	0	1	0	0	0	7
8	0	0	0	0	0	10

*alle Werte abzüglich des mittleren Backgrounds von 17 cpm

D. DISKUSSION

Die Versuche zeigen, daß durch intraventrikuläre Applikation von Morphinantagonisten bei morphinabhängigen Ratten ein Entzugsmuster ausgelöst werden kann, das dem nach systemischer Applikation der Antagonisten vergleichbar ist. Im Fall der lipophilen Antagonisten wie Levallorphan, Nalorphin und Naloxon, die leicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden, war für die meisten Symptome das Verhältnis äquipotenter Dosen i.ventr.: i.p. Applikation 1:10. Wurde der quaternäre Antagonist verabreicht, der die Blut-Hirn-Schranke nur schwer passiert, so war dieses Verhältnis in der Größenordnung 1:1000. Man kann aus diesen Ergebnissen schließen, daß vom VS aus leicht zu erreichende Strukturen als Wirkungsorte für die meisten in der vorliegenden Untersuchung erfaßten Abstinenzzeichen in Frage kommen. (Nur bei einzelnen Symptomen scheinen besondere Verhältnisse vorzuliegen; sie werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.) Ähnliche Ergebnisse wurden an Affen (Eidelberg und Barstow, 1971), Kaninchen (Herz et al., 1972) und Ratten (Watanabe, 1971) erzielt, während i.ventr. Applikation von Nalorphin bei Mäusen kaum Abstinenzzeichen auslöste (Maggiolo und Huidobro, 1966). Dieses letztere negative Ergebnis ist möglicherweise auf zu geringe Dosierung des Antagonisten zurückzuführen (siehe Herz et al., 1972).

Das Symptom jumping blieb nach i.ventr. Gabe von Levallorphan, Nalorphin und Naloxon im Niveau niedrig. Die Ursache dafür ließ sich nicht befriedigend erklären. Auch größere Volumina, die mit Sicherheit eine Ausbreitung der Substanz im gesamten VS gewährleisten, führten nicht zu signifikant höheren jumping-Raten. Die Vermutung, daß das jumping sich nur deshalb so schwach entwickelt, weil kaudale Strukturen nicht erreicht werden, ist demnach unwahrscheinlich. Dagegen sprechen auch die Versuche mit SH 254, bei denen hohe jumping-Raten nach i.ventr. Applikation der Substanz erzielt wurden. Diese Experimente demonstrieren, daß auch das jumping von ventrikelnahen Strukturen ausgelöst werden kann. Möglicherweise wird die Entwicklung von jumping nach i.ventr. Applikation bestimmter Antagonisten auf noch unbekannte Art und Weise gehemmt. Die Hemmung findet

offenbar nicht statt, wenn die betreffenden Substanzen sich vorwiegend im 4. Ventrikel und kaudalen Aquaedukt ausbreiten, wie die Ergebnisse der Ventrikelabgrenzungsversuche zeigen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diese Zusammenhänge (siehe auch Bläsig et al., in Vorbereitung) weiter aufzuklären.

Angriffspunkte für die Auslösung der Symptome Diarrhoe und writhing

Die Versuche mit Diallyl-nor-morphin zeigten am eindeutigsten, daß die meisten der gezählten und abgefragten Symptome, einschließlich der sekretorischen Abstinenzzeichen Rhinorrhoe, Salivation und roter Tränenfluß über zentrale Angriffspunkte der Antagonisten ausgelöst werden. Die Symptome Diarrhoe und writhing hingegen waren nach i.ventr. Gabe aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antagonisten kaum auszulösen. Es sollen zunächst die die Diarrhoe betreffenden Befunde diskutiert werden.

Nach i.p. Injektion der tertiären Antagonisten war die Diarrhoe bereits bei niedrigen Dosen stark ausgeprägt. Dagegen löste i.ventr. Applikation der Substanzen das Symptom erst bei höheren Dosen aus. Das Niveau blieb niedrig. Dieses Ergebnis stellte sich auch bei i.ventr. Gabe der quarternären Substanz Diallyl-nor-morphin ein. Nachdem der quarternäre Antagonist nur sehr schwer durch die Blut-Hirn-Schranke zurück in die Blutbahn gelangt, ließ dieser Befund vorerst an einen peripheren Angriffspunkt denken. Auch die Ergebnisse mit den tertiären Antagonisten sprachen nicht gegen diese Vermutung. Es gibt einige Angaben in der Literatur darüber, daß der Hunde- (Burks et al., 1974) und Meerschweinchendarm (Goldstein und Schulz, 1973) nach chronischer (in vivo) Morphinbehandlung Toleranz gegenüber dem Opiat entwickeln (in vitro Test nach der Morphinbehandlung). Im Hinblick auf den engen Zusammenhang zwischen Toleranz und Abhängigkeit könnte man annehmen, daß Strukturen im Darm selbst Abhängigkeit entwickeln und dann daraus schließen, daß das Abstinenzzeichen Diarrhoe peripheren Ursprungs ist. Dagegen sprechen allerdings die vorliegenden Befunde, nach denen auch i.p. verabreichtes Diallyl-nor-morphin die Diarrhoe kaum hervorrief. Die schwache Ausprägung der Diarrhoe nach i.ventr. Applikation könnte dann in der Weise erklärt werden, daß die für dieses Abstinenzzeichen verantwortlichen zentralen Strukturen von den Antagonisten nur schwer

über das VS erreicht werden können. Diese Interpretation wird durch Ergebnisse früherer Untersuchungen (Herz et al., unveröffentlicht) unterstützt, bei denen hohe Dosen von N-methyl-morphin, einer quartären Substanz, 20 Tage lang 3 x täglich i.p. an Ratten verabreicht wurden. In diesen Experimenten konnten durch Antagonisten keine Entzugszeichen, auch nicht Diarrhoe, provoziert werden. Vergleichbare Ergebnisse erzielte auch Watanabe (1971), der bei Ratten mittels chronischer i.ventr. Injektionen von Morphin Abhängigkeit erzeugte. Injizierte er diesen Tieren Levallorphan, so konnte er das Symptom Diarrhoe nur sehr schwer auslösen, während eine Reihe anderer Symptome vergleichsweise leicht hervorzurufen waren. Alle diese Befunde bestärken die Annahme, daß die Obstipation nach akut verabreichtem Morphin zentralen Ursprungs ist (siehe Weinstock, 1971).

Auch die für das Symptom writhing erzielten Ergebnisse sind nicht ganz eindeutig. Nachdem dieses Abstinenzzeichen lediglich systemisch, nicht aber i.ventr. durch Diallyl-nor-morphin auszulösen war, könnte man hier einen peripheren Ursprung postulieren. Es wäre dann jedoch zu erwarten, daß die bei i.p. Applikation wirksamen Dosen der quartären Substanz sehr viel geringer sind als diejenigen, die zur Auslösung der Symptome mit ventrikelnahem Ursprungsort erforderlich sind. Das war jedoch nicht der Fall. Interessanterweise wurde writhing aber bei i.p. Verabfolgung des tertiären Analogs Nalorphan durch deutlich niedrigere Dosen hervorgerufen als bei i.p. Gabe der quartären Substanz. Unter der Voraussetzung, daß die peripheren Morphinrezeptoren gleiche Eigenschaften wie die zentralen aufweisen, muß man annehmen, daß diese etwas höhere Wirksamkeit der tertiären Substanz auf ihre bessere Permeationsfähigkeit in das Gehirn zurückzuführen ist. Daraus ergibt sich, daß auch writhing sehr wahrscheinlich zentral ausgelöst wird, wobei der Wirkungsort für die Antagonisten schwer vom VS her zu erreichen ist.

Angriffspunkte in der Umgebung des kaudalen Aquaedukts und des 4. Ventrikels

Die Versuche, in denen Antagonisten in durch Plomben voneinander getrennte Abschnitte des Ventrikelsystems injiziert wurden (siehe auch Einleitung) führten zu ähnlichen Ergebnissen wie die früheren Befunde von Herz et al. (1972) am Kaninchen. Konnte sich der in den Seitenventrikel injizierte Antagonist nicht in die kaudalen Ventrikelabschnitte ausbreiten, so kam es nur zu einem schwachen Entzugsbild mit wet dog shaking als hauptsächlichem Symptom, während gleiche, in den 4. Ventrikel applizierte Dosen starke Abstinenzerscheinungen provozierten. So ließ sich das Symptom jumping im 4. Ventrikel bereits durch sehr kleine Dosen auslösen, wohingegen es nach Applikation selbst hoher Antagonistendosen in die rostral des Aquaedukts gelegenen Ventrikelabschnitte entweder gar nicht oder nur vereinzelt auftrat. Wahrscheinlich ist auch dieses bei hohen Dosen induzierte jumping darauf zurückzuführen, daß trotz des plombierten Aquaedukts Substanz in die kaudalen Abschnitte des VS permeierte. Darauf weisen vor allem die Versuche mit radioaktiv markiertem Levallorphan hin, die zeigten, daß das Auftreten von jumping stets mit Radioaktivität im Liquor verbunden war. Auch die übrigen nach Applikation der Antagonisten in die vorderen Ventrikelabschnitte beobachteten, ein schwaches Entzugsbild kennzeichnenden Symptome (wie z.B. wet dog shaking) werden möglicherweise auf diese Weise ausgelöst. Selbst bei regulärem Sitz der Plombe gelangten nämlich stets geringe Antagonistenmengen in den 4. Ventrikel (etwa 1/10 - 1/20 der injizierten Radioaktivität wurden in der Regel im Liquor der Tiere wiedergefunden). Solche geringen Substanzmengen können durchaus ein schwaches Entzugsgeschehen hervorrufen, das dem nach i.ventr. Verabfolgung ähnlich niedriger Dosen vergleichbar ist. Ein weiterer Hinweis für diese Annahme ist die Beobachtung, daß die Schwelle auch für das Auslösen von wet dog shaking bei Injektion von Levallorphan in den 4. Ventrikel weit niedriger war, als bei Applikation in die abgegrenzten rostralen Ventrikelabschnitte. Ähnliches gilt für die abgefragten Symptome, wobei sich die hier weniger deutliche Aussage mit der nur halbquantitativen Erfassung dieser Symptome erklären läßt. Diese starken Effekte traten nicht mehr auf, wenn die Eucerinplombe etwas weiter kaudal saß, so daß sich die Substanz nur in den

mittleren und kaudalen Abschnitt des 4. Ventrikels und im Subarachnoidalraum ungehindert ausbreiten konnte. Man muß daraus schließen, daß die von dort erreichbaren Gebiete keine so entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Morphinabhängigkeit spielen dürften. Das ist vor allem im Hinblick auf Ursprungskerne dopaminergere Bahnen wie der Substantia nigra von Interesse, nachdem Versuche mit Durchschneidung des nigro-striatalen Faserbündels einen Einfluß dieses Systems auf das Entzugsgeschehen vermuten lassen (Pozuelo und Kerr, 1972).

Auch die Mikroinjektionsversuche lassen fraglich erscheinen, ob bedeutsame primäre Angriffspunkte des Morphins rostral des Aquaedukts lokalisiert sind. Offensichtlich keine Rolle spielt der Nucleus caudatus, während eine Beteiligung thalamischer Strukturen zunächst wegen des hier häufiger provozierbaren schwachen bis mäßig starken Entzugsgeschehens in Betracht gezogen werden mußte. Dies stimmte in gewisser Weise mit den Befunden von Wei und Mitarbeitern (1972) überein, die nach Applikation von kristallinem Naloxon in den Bereich des medialen Thalamus Entzugssymptome wie wet dog shaking oder exploring ausgelöst und daher vor allem dieses Kerngebiet als primären Wirkungsort postuliert hatten. Auf Grund der Ergebnisse der eigenen Mikroinjektionsversuche mit radioaktiv markiertem Levallorphan ließ sich allerdings der Verdacht nicht ausräumen, daß die in thalamischen Strukturen ausgelösten Entzugszeichen möglicherweise auf unkontrollierte Substanzausbreitung zurückzuführen sind. Nach Injektionen von ³H-Levallorphan in mediale Kerngebiete des Thalamus konnten nämlich in keinem einzigen Fall Entzugssymptome in nennenswertem Umfang beobachtet werden, wenn die Substanz am Injektionsort lokalisiert blieb. Breitete sie sich dagegen in das VS aus, kam es zu wiederholten Entzugssymptomen. Der gleiche Befund wurde bei bilateralen Injektionen in den Nucleus caudatus erzielt. Nach diesen Ergebnissen ist es für die hier erfaßten Entzugserscheinungen sehr zweifelhaft, ob thalamische Strukturen primäre Wirkungsorte der Antagonisten darstellen; wenn ja, dann dürften diese sicher von untergeordneter Bedeutung sein.

Diese Ergebnisse veranschaulichen die Problematik der viel verwendeten Mikroinjektionstechnik. Selbst bei dem hier verwendeten geringen Injektionsvolumen von nur 1 μ l blieb die Substanz häufig nicht am Injektionsort, sondern breitete sich über den Stichkanal in das VS bis in den Subarachnoidalraum hinein aus. Auch durch Applikation kristalliner Substanz, einer Methode, die vielfach gegenüber der Injektion von Lösungen bevorzugt wird (Weiet al., 1972), läßt sich diese Gefahr nicht ausschließen. Es wurden dabei nämlich sehr hohe Dosen appliziert (etwa 20 bis 40 mal so hoch wie in den vorliegenden Mikroinjektionsversuchen). In jedem Fall muß man bei Anwendung dieser Technik fordern, eine etwaige Diffusion der Substanz in das VS und zudem ihre Ausbreitung am Injektionsort zu prüfen.

In der vorliegenden Arbeit wurden erst durch Mikroinjektionen in mediale Bereiche des Mittelhirns unterhalb des Aquaedukts und in den Boden des 4. Ventrikels starke Wirkungen ausgelöst. Diese Befunde geben innewein einen weiteren, wenn auch wegen der besprochenen Problematik weniger eindeutigen Hinweis darauf, daß vor allem im unteren Hirnstamm die für die Entwicklung der Morphinabhängigkeit wichtigsten Zentren lokalisiert sein müssen. Auch hier kann keinesfalls eine Beschränkung der Wirkung auf die Injektionsstellen angenommen werden.

Beziehung zwischen Rezeptoraffinität und pharmakologischer Wirksamkeit am Beispiel des Symptoms writhing

Nach i.ventr. Applikation zeigten Nalorphin und sein quarternäres Analog Diallyl-nor-morphin eine ähnliche Wirksamkeit. Dieses Ergebnis ist vor allem insofern von Bedeutung als die Affinität von Nalorphin zum Morphinrezeptor etwa 10 mal so hoch ist wie die von Diallyl-nor-morphin (in vitro Versuche an Rattenhirnhomogenat; Höllt, 1974, unveröffentlicht). Eine Erklärung für die etwa gleich starke in vivo Wirksamkeit beider Substanzen nach i.ventr. Applikation ist möglicherweise in ihren unterschiedlichen Permeationseigenschaften zu suchen. Als hydrophile Substanz dringt Diallyl-nor-morphin zwar vergleichsweise langsam in das Gehirngewebe ein, wandert aber dann auch nur langsam in die Blutbahn ab. Dadurch wird über längere Zeit ein hoher

Gewebsspiegel aufrechterhalten. Auf Grund dieser Pharmakokinetik sind hydrophile Substanzen, z.B. morphinartige Analgetica nach i.ventr. Applikation vergleichsweise wirksamer als lipophile, die zwar schnell in das Gewebe eindringen, es aber innerhalb kurzer Zeit auch wieder verlassen (Herz und Teschemacher, 1971). Das würde bedeuten, daß die geringere Affinität der quarternären Substanz zum Rezeptor durch ihre andersartige Kinetik ausgeglichen wird. Ob die in vitro gefundene Affinität von Morphinantagonisten zum Morphinrezeptor ein Maß für ihre pharmakologische Wirksamkeit (in vivo) ist, kann aus diesen Ergebnissen nicht beantwortet und muß weiter untersucht werden.

Vorstellungen über Lage und Zusammenspiel der an der Manifestation des Entzugssyndroms beteiligten Strukturen

Zweifellos sind bei den akuten Effekten des Morphins mehrere verschiedene Angriffspunkte beteiligt. Man könnte annehmen, daß alle diese in Frage kommenden Strukturen auch Toleranz und Abhängigkeit entwickeln. Es wären demnach auch bei der Manifestation des Entzugssyndroms eine Reihe verschiedener Wirkungsorte in Betracht zu ziehen. Wenn das zutrifft, müßten einzelne Symptome bevorzugt von bestimmten Gebieten her auszulösen sein. Das konnte in der vorliegenden Arbeit aber nicht gezeigt werden: Nahezu das gesamte komplexe Abstinenzsyndrom wurde von einem relativ umgrenzten Areal (rostraler Bereich der Rautengrube und kaudales periaquaeduktales Grau) aus induziert. Möglicherweise ist der Grund dafür darin zu suchen, daß die einzelnen Wirkungsorte für die in den vorliegenden Versuchen erfaßten Abstinenzsymptome im Hirnstamm sehr nah beieinander liegen und die bisher verwendeten Methoden für eine Differenzierung nicht ausreichen. In diesem Zusammenhang ist auch auf den 'shift' der Symptome hinzuweisen, der in der vorliegenden Arbeit nach i.ventr. Gabe von Antagonisten und (weniger ausgeprägt) auch nach Applikation der Substanzen in den abgegrenzten 4. Ventrikel beobachtet wurde. Diese Befunde weisen auf ein die Entzugssymptome koordinierendes 'Zentrum' hin, das offenbar sowohl über die Blutbahn als auch über das Ventrikelsystem oder den abgegrenzten 4. Ventrikel angesprochen wird.

Anatomisches Korrelat

Die Befunde zeigen, daß wesentliche Symptome des Entzugsgeschehens über Strukturen des Hirnstamms vermittelt werden. In Frage kommen vor allem Kerngebiete im rostralen Bereich der Rautengrube und/oder im kaudalen periaqueductalen Grau. Diese Strukturen näher einzugrenzen war jedoch mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden nicht möglich. Dazu sollen zur Zeit durchgeführte autoradiographische Studien verhelfen: In Versuchen mit plombiertem VS wird die Ausbreitung radioaktiv markierter Antagonisten im Gewebe mit der jeweils beobachteten Entzugssymptomatik korreliert; die rostro-kaudale Lage der Eucerinplombe wird dabei variiert.

Es scheint sich dabei um ähnliche Strukturen zu handeln wie die für die antinozizeptive Wirkung des Morphins verantwortlichen Regionen (Herz et al., 1970; Mayer et al., 1971; Pert und Yaksch, 1975; Akil et al., 1972). Die Frage, ob einige der Abstinenzzeichen eine Abhängigkeitsentwicklung des 'nozizeptiven Systems' widerspiegeln, kann durch die vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht beantwortet werden; möglicherweise hyperalgetische Reaktionen wie scream on touch oder Beißen und Schnappen nach taktiler Stimulation während des Entzugs könnten ein Hinweis auf Abhängigkeit derartiger Strukturen sein.

Auch die Rolle bestimmter im Hirnstamm gelegener Ursprungskerne verschiedener aufsteigender und sich in Hirnrinde, Zwischenhirn und limbischen System verzweigender Fasersysteme ist noch ungeklärt. Eine der in Frage kommenden Strukturen ist dabei das Raphe-Kerngebiet. Nach elektrothermischer Koagulation dieser serotonergen Strukturen konnte eine signifikante Reduktion der jumping-Rate morphinabhängiger Ratten beobachtet werden, andere Abstinenzzeichen blieben jedoch unverändert (Bläsig et al., in Vorbereitung). Die gleichen Autoren fanden keine signifikante Beeinflussung der antinozizeptiven Morphinwirkung bei Tieren mit zerstörtem Raphesystem (Bläsig et al., 1973^b). Zur Rolle des Noradrenalins vorgenommene Experimente von Herz und Mitarbeitern (1974) wiesen auf einen Einfluß dieses Transmitters bei der Manifestation des Entzugsgeschehens hin, während seine Rolle bei der Abhängigkeitsentwicklung sehr fraglich ist (Bläsig et al., 1974).

Inwieweit der Locus coeruleus, in dem das dorsale (noradrenerge) Faserbündel entspringt, Entzugsmanifestation und Abhängigkeitsentwicklung beeinflußt, wird zur Zeit untersucht.

In den aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit in Frage kommenden Gebieten wurde auch eine hohe stereospezifische Bindungskapazität für Opiate nachgewiesen (Kuhar et al., 1973; Simon, 1974).

Allerdings gehören auch der Nucleus caudatus und die Amygdala zu den Kerngebieten mit hoher stereospezifischer Bindungskapazität, obwohl beide Strukturen offenbar keinen Einfluß auf die Manifestation des Entzugsgeschehens haben: In der vorliegenden Untersuchung waren die Mikroinjektionen in den Nucleus caudatus in Bezug auf das Auslösen von Entzugssymptomen nahezu völlig wirkungslos; elektrolytische Zerstörung der Amygdala beeinflusste das Entzugssyndrom morphinabhängiger Ratten nicht (Wikler et al., 1972). Diese Befunde zeigen, daß derzeit noch unklar ist, ob alle Regionen mit hoher stereospezifischer Opiatbindung für die pharmakologische Morphinwirkung von Bedeutung sind.

E ZUSAMMENFASSUNG

1. Chronische Zufuhr von Morphin und anderen morphinartig wirksamen Substanzen (Opiate) führt im Wirbeltierorganismus zu körperlicher Abhängigkeit. Bei Unterbrechung der Substanzzufuhr oder bei Applikation spezifischer Morphinantagonisten, die das Morphin kompetitiv von seinem Rezeptor verdrängen, wird die Abhängigkeit sichtbar: Es kommt zu einem durch charakteristische Symptome gekennzeichneten Entzugssyndrom. Die lokale Applikation von Morphinantagonisten bietet somit die Möglichkeit, Aufschluß über Angriffspunkte des Morphins bei der Entwicklung der körperlichen Abhängigkeit zu erhalten. Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen ist die Lokalisation dieser Angriffspunkte an der Ratte.
2. Durch intraperitoneale bzw. intraventrikuläre Injektion verschiedener Morphinantagonisten wurde bei morphinabhängigen Ratten das Entzugsgeschehen provoziert. Der Vergleich der bei beiden Applikationsweisen erzielten Ergebnisse läßt darauf schließen, daß die meisten der in der vorliegenden Arbeit erfaßten Symptome von Strukturen her ausgelöst werden, die von den Antagonisten leicht vom Ventrikelsystem aus erreicht werden. Das wird besonders deutlich aus dem großen Unterschied äquipotenter Dosen nach intraventrikulärer bzw. intraperitonealer Gabe des quaternären Antagonisten Diallyl-nor-morphin (Größenordnung i. ventr.: i. p. Injektion 1:1000). Die mit dem Benzomorphanderivat SH 254 erzielten Ergebnisse zeigen, daß auch das Symptom jumping, das nach intraventrikulärer Gabe der anderen Antagonisten nur schwach ausgeprägt war, über ventrikelnähe Kerngebiete ausgelöst wird.
3. Die Wirkungsarten für die Auslösung der Symptome writhing und Diarrhoe konnten nicht ganz zweifelsfrei lokalisiert werden. Die vorliegenden Befunde werden am besten durch die Annahme erklärt, daß diese beiden Symptome zwar über zentrale aber vom Ventrikelsystem aus nur schwer erreichbare Strukturen ausgelöst werden.
4. Zur genaueren Lokalisation der ventrikelnähen Strukturen wurden Antagonisten in die durch eine Plombe im Aquaeductus mesencephali abgegrenzten rostralen und kaudalen Abschnitte des Ventrikelsystems injiziert. Während Applikation in den abgegrenzten Seitenventrikel und 3. Ventrikel nur 'schwache' Abstinenzzeichen auslöste, rief Injektion der Sub-

stanzen in den abgegrenzten 4. Ventrikel ein schweres Entzugsbild hervor. In letzterem Fall wurde das Symptom jumping bereits bei niedrigen Antagonistendosen beobachtet; bei höheren Dosen kam es auch zu flying. Beide Symptome sind charakteristisch für starken Entzug.

5. Durch Mikroinjektion von Levallorphan in verschiedene Areale des ZNS ließen sich in rostral des Aquaedukts gelegenen Bereichen sehr viel schwächere Wirkungen erzielen als bei Injektionen in das Mittelhirn oder in die Rautengrube. Die Befunde der Mikroinjektionsversuche werden unter Berücksichtigung der in Versuchen mit ^3H -Levallorphan beobachteten Substanzausbreitung interpretiert. Die Problematik der Methode wird diskutiert.
6. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen darauf schließen, daß Hirnstammstrukturen bei der Entwicklung der Morphinabhängigkeit von entscheidender Bedeutung sind. Die in Frage kommenden Kerngebiete befinden sich vermutlich im rostralen Bereich der Rautengrube und/oder im kaudalen periaquaeduktalen Grau.

F. LITERATUR

- Adler, T.K.: The comparative potencies of codeine and its demethylated metabolites after intraventricular injection in the mouse. *J.Pharmac. exp.Ther.* 140: 155-161 (1963).
- Adler, T.K.: CNS localisation, biological disposition and analgesic action of morphine and codeine after intraventricular injection in mice. *Fedn.Proc.* 23: 283 (1964).
- Albus, K.: Method for application of drugs into separated parts of the cerebroventricular system. *Physiology and Behaviour* 8: 569-571 (1971).
- Albus K. und A. Herz: Inhibition of behavioural and EEG-araisal induced by nociceptive and non-nociceptive stimulation following morphine action on the lower brain stem neurones. *Electroenceph.clin.Neurophysiol.* 33: 579-590 (1972).
- Akil, H., D.J. Mayer und J.C. Liebeskind: Comparaison chez le rat entre analgésie induite par stimulation de la substance grise péri-aquae-ductale et l'analgésie morphinique. *C.R.Acad.Sc.*, 274: 3603-3605 (1972).
- Amit, Z., M.E. Corcoran, S. Amir und G. Urca: Ventral hypothalamic lesions block the consumption of morphine in rats. *Life Sciences* 13: 805-816, (1973).
- Bläsigg, J., A. Herz, K. Reinhold und S. Zieglgänsberger: Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats. *Psychopharmacologia (Berl.)* 33: 19-38 (1973^a).
- Bläsigg, J., K. Reinhold und A. Herz: Effect of 6-hydroxydopamine, '5,6-dihydroxytryptamine and raphe lesions on the antinociceptive actions of morphine in rats. *Psychopharmacologia (Berl.)* 31: 111-119 (1973^b).
- Bläsigg, J., R. Papeschi und A. Herz: Bedeutung der Katecholamine bei der Manifestation des Morphinentzugs bei der Ratte. *Arzneimittelforschung* 24: 1015-1016 (1974).
- Buckett, W.R.: A new test for morphine-like physical dependence (addiction liability) in rats. *Psychopharmacologia (Berl.)* 6: 410-416 (1964).
- Burks, T.F., D.L. Jaquette und M.N. Grubb: Development of tolerance to the stimulatory effect of morphine in dog intestine. *Europ.J.Pharmacol.* 25: 302-307 (1974).
- Cox, B.M. und M. Weinstock: Quantitative studies of the antagonism by nalorphine of some of the actions of morphine-like analgesic drugs. *Brit.J.Pharmacol.Chemotherap.* 27: 81 (1966).

- Eidelberg, E. und C.A. Barstow: Morphine tolerance and dependence induced by intraventricular injection. *Science* 174: 74-76 (1971).
- Goldstein, A. und R. Schulz: Morphine-tolerant longitudinal muscle strip from guinea-pig ileum. *British J.Pharmacol.* 48: 655-666 (1973).
- Halbach, H. und H.B. Eddy: Tests for addiction (chronic intoxication) of morphine type. *Bull.Wld.Hlth.Org.* 28: 139-173 (1963).
- Herz, A., K. Albus, T. Metyš, P. Schubert und Hj.Teschemacher: On the central sites for the antinociceptive action of morphine and fentanyl. *Neuropharmacology* 9: 539-551 (1970).
- Herz, A. und Hj. Teschemacher: Activities and sites of antinociceptive action of morphine-like analgesics. *Adv Drug Res.* 6: 79-119 (1971).
- Herz A., Hj. Teschemacher, K. Albus und S. Zieglgänsberger: Morphine abstinence syndrome in rabbits precipitated by injection of morphine antagonists into the ventricular system and restricted parts of it. *Psychopharmacologia (Berl.)* 26: 219-235 (1972).
- Herz, A. und Hj. Teschemacher: Development of tolerance to the antinociceptive effect of morphine after intraventricular injection. *Experientia* 29: 64 (1973).
- Herz A.: Central nervous sites of action of morphine in dependent and non-dependent rabbits. In: *Pharmacology and the future of man*, 5th Internat.Congr.Pharmacol., San Francisco, 1972, p.125-135; Ed.: Karger, Basel, 1973.
- Herz, A., J. Bläsigg und R. Papeschi: Role of catecholaminergic mechanisms in the expression of the morphine abstinence syndrome in rats. *Psychopharmacologia (Berl.)* 39: 121-143 (1974).
- Herz, A. und J. Bläsigg: Neurobiologische Aspekte der Morphin-Abhängigkeit. *Die Naturwissenschaften* 61 (6): 232-238 (1974).
- Horlington, M. und M.T. Lockett: Antagonism between alkylated and non-compounds of the morphine group injected intracisternally to mice. *J.Pharm.Pharmac.* 11: 415-420 (1959).
- Kerr, F.W.L. und J. Pozuelo: Suppression of physical dependence and induction of hypersensitivity to morphine by stereotaxic hypothalamic lesions in addicted rats. *Mayo Clinic Proc.* 46: 653-665 (1971).
- Kuhar, M.J., C.B. Pert und S. Snyder: Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* 245: 447-450 (1973).
- König, T.F. und R.A. Klippel: The rat brain: A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. The Williams and Williams Comp., Baltimore (1963).

- Lockett, M.F. und M.M. Davis: The analgesic action of normorphine administered intracisternally to mice. *J.Pharm.Pharmac.* 10: 80-85 (1958).
- Maggiolo, C. und F. Huidobro: Intraventricular administration of nalorphine to mice implanted with pellets of morphine. *Nature* 211: 540-541 (1966).
- Mayer, D.J., T.L. Wolfe, H. Akil, B. Carder und J.C. Liebeskind: Analgesia from electrical stimulation of the brain stem of the rat. *Science* 174: 1351-1354 (1971).
- Pert, C.P. und S.H. Snyder: Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014 (1973).
- Pert, A. und T. Yaksh: Sites of morphine induced analgesia in the primate brain: Relation to pain pathways. *Science* (1975) (in press).
- Pozuelo, J. und F.W.L. Kerr: Suppression of craving and other signs of dependence in morphine-addicted monkeys by administration of alpha-methyl-para-tyrosine. *Mayo Clinic Proc.* 47: 621-628 (1972).
- E.J. Simon: Opiate receptors in human and animal brain. IX^e CINP Congress Paris 1974. *J.Pharmacol.(Paris)* t.5, Suppl.1: 44 (1974).
- Hj. Teschemacher, P. Schubert und A. Herz: Autoradiographic studies concerning the supraspinal site of the antinociceptive action of morphine when inhibiting the hindleg flexor reflex in rabbits. *Neuropharmacology* 12: 123-131 (1973).
- K. Tsou und C.S. Jang: Studies on the site of analgesic action of morphine by intracerebral microinjection. *Scientia Sinica* 8: 1099-1109 (1964).
- Vigouret, J., Hj. Teschemacher, K. Albus und A. Herz: Differentiation between spinal and supraspinal sites of action of morphine when inhibiting the hindleg withdrawal reflex. *Neuropharmacology* 12: 111-121 (1973).
- Watanabe, H.: The development of tolerance to and of physical dependence on morphine following intraventricular injection in the rat. *Jap.J. Pharmacol.* 21: 383-391 (1971).
- Way, E.L., H.H. Loh und F.H. Shen: Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. *J.Pharmacol. exp.Therap.* 167: 1-8 (1969).
- Way, E.L. und A. Herz: Biochemie des Morphins und morphinähnlicher Substanzen. In: Sucht und Mißbrauch. Hrsgb. Steinbrecher und Solms, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1975).

- Wei, E., H.H. Loh und E.L. Way: Neuroanatomical correlates of morphine dependence. *Science* 177: 616-617 (1972).
- Weinstock, M.: Sites of action of narcotic analgesic drugs in peripheral tissues. In: *Narcotic Drugs, Biochemical Pharmacology*. Ed.: D. Clouet; Plenum, New York, p.394-405 (1971).
- Wikler, A., H. Norrell und D. Miller: Limbic system and opioid addiction in the rat. *Exptl. Neurol.* 34: 543-557 (1972).
- Zeman, W. und J.R.H. Innes: *Cragie's neuroanatomy of the rat*. Academic Press, New York and London (1963).

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Professor Dr. A. Herz für die Überlassung des Themas und für sein großes Interesse an allen bei der vorliegenden Arbeit aufgetauchten Fragen.

Herrn Dr. Hj. Teschemacher danke ich für Ratschläge und methodische Hinweise. Für Rat und Unterstützung in anatomischen Fragen danke ich Herrn Dr. P. Mehraein.

Schließlich danke ich allen Mitarbeitern des Labors und Instituts - insbesondere Frau E. Cohnen, Frau K. Stöltzing und Herrn M. Carrig -, die mir bei den Vorbereitungen der Versuche und bei der technischen Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit behilflich waren.

